

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 822 157

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

01 03691

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 14/325, C 12 N 15/32, 15/63, 15/75, 15/62, 15/01, C 07 K 16/12, C 12 P 21/02, A 01 H 5/00, 5/10

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ TOXINE INSECTICIDE DE BACILLUS THURINGIENSIS MODIFIÉE SENSIBLE A LA PEP-SINE.

②② Date de dépôt : 19.03.01.

③⑦ Priorité :

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : AVENTIS CROPS SCIENCE SA
Société anonyme — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 20.09.02 Bulletin 02/38.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 31.10.03 Bulletin 03/44.

⑦② Inventeur(s) : FREYSSINET GEORGES, RANG
CECILE et FRUTOS ROGER.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

⑦③ Titulaire(s) :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦④ Mandataire(s) : BAYER CROPS SCIENCE S.A..

FR 2 822 157 - B1



**Toxine insecticide de *Bacillus thuringiensis* modifiée
sensible à la pepsine**

La présente invention concerne la dégradation des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* dans le tractus digestif des mammifères. Elle a pour objet des protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* dont la séquence peptidique a été modifiée de manière à les rendre sensibles aux enzymes spécifiques du tractus digestif des mammifères, en particulier aux pepsines. Selon cette invention, les protéines Cry sont modifiées par insertion de sites de coupure par la pepsine dans leur séquence peptidique. L'invention concerne également des plantes transformées exprimant ces protéines Cry modifiées.

Les bactéries de l'espèce *Bacillus thuringiensis* (ci-après *Bt*) sont bien connues pour les toxines insecticides qu'elles produisent. Ces bactéries à Gram-positif forment un cristal protéique parasporal au cours de leur phase de croissance stationnaire, lequel cristal est largement responsable de leur activité insecticide. Le cristal de ces bactéries est constitué d'une toxine insecticide de nature protéique nommée protéine Cry et codée par un gène *cry*. De par ses propriétés insecticides, cette protéine Cry a été employée en protection des cultures contre les insectes ravageurs, en tant que solution alternative aux insecticides de synthèse. Actuellement, cette utilisation agronomique se réalise essentiellement par deux méthodes, l'épandage direct du produit en tant que biopesticide, et la transformation génétique des plantes cultivées avec un gène codant pour une protéine Cry. Selon les souches de *Bt* dont elles sont issues, les protéines Cry ont des activités insecticides vis-à-vis de spectres d'insectes différents. Les principaux ordres d'insectes contre lesquels sont actives les toxines Cry sont les Lépidoptères, les Coléoptères et les Diptères, mais certaines toxines sont efficaces vis-à-vis d'autres ordres d'insectes. L'ensemble des protéines Cry isolées des différentes souches de *Bt* est rassemblé dans une classification en fonction de leurs homologies de séquences, et un code leur est attribué afin de les distinguer (Crickmore et al., 1998, Microbiol. Molec. Biol. Review 62(3), 807-813). L'intérêt de l'utilisation de ces toxines en agriculture réside donc dans leur spécificité d'action vis-à-vis d'un ou de plusieurs ordres d'insectes donnés, mais aussi dans leur absence de toxicité vis-à-vis des mammifères, des oiseaux, des amphibiens et des reptiles.

Cette absence de toxicité vis-à-vis des mammifères a permis le développement de la culture de plantes transgéniques exprimant une protéine Cry et l'utilisation des graines de ces plantes pour l'alimentation humaine et animale. Toutefois, bien que non toxiques vis-à-vis des

mammifères, certaines de ces protéines sont peu dégradées dans le tractus digestif des mammifères, et cette absence de dégradation conduit à une persistance relativement longue de la toxine dans le tractus digestif desdits mammifères. En outre, l'absence de persistance des protéines Cry dans le tractus digestif des mammifères est un des critères pris en compte par les autorités administratives (par exemple, l'Agence pour la Protection de l'Environnement - EPA - des Etats-Unis) délivrant des autorisations de mise sur le marché alimentaire de graines contenant ces protéines ou de produits issus de ces graines.

La présente invention permet de pallier l'inconvénient ci-dessus mentionné. Cette invention est basée sur le principe selon lequel la stabilité de certaines protéines Cry dans le tractus digestif des mammifères serait due à une absence de sensibilité de ces protéines aux enzymes spécifiques dudit tractus digestif, en particulier aux protéases. La solution à ce problème réside donc dans l'intégration artificielle de sites spécifiques, propres aux enzymes du tractus digestif des mammifères, dans la protéine Cry. La présente invention a donc pour objet des protéines Cry modifiées sensibles aux enzymes spécifiques du tractus digestif des mammifères, en particulier les protéases spécifiques de l'estomac des mammifères, et plus particulièrement les pepsines. La pepsine est une enzyme particulière de la famille des protéases, et elle est majoritairement présente dans l'estomac des mammifères (95% des protéases stomacales). Il s'agit d'une protéase à site aspartique agissant à un pH optimum égal à 2. La pepsine est une enzyme de choix comme source de dégradation des protéines Cry car elle n'est pas présente dans le tube digestif des insectes, en particulier des lépidoptères dont le pH du tube digestif est compris entre 10 et 11 (Terra, W. B. and C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B : 1-62.). Cette absence de pepsine chez les insectes est donc une garantie que l'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans les protéines Cry ne présente pas de risque d'augmentation de leur dégradation dans le tube digestif des insectes. La présente invention est donc une solution au problème technique ci-dessus exposé, à savoir une augmentation de la sensibilité des protéines Cry aux enzymes du tractus digestif des mammifères, sans altération des propriétés insecticides desdites protéines Cry.

Toutefois, la protéine Cry est une protéine très organisée dont la forme activée est composée de trois domaines, et dans laquelle les relations structure-fonction sont très fortes dans et entre les domaines. Ce niveau d'organisation important des protéines Cry ne permet pas l'insertion aléatoire de mutations dans la protéine. En effet, l'insertion de sites de coupure spécifiques aux enzymes stomacales de mammifères ne doit pas altérer les propriétés insecticides

des toxines.

Les protéines Cry sont naturellement produites par la bactérie *Bacillus thuringiensis* sous forme de protoxines inactives. Le mode d'action naturel de ces protéines implique la solubilisation du cristal protéique dans l'intestin de l'insecte, la dégradation protéolytique de la protoxine libérée, la fixation de la toxine activée sur les récepteurs de l'intestin des insectes, et l'insertion de la toxine dans la membrane apicale des cellules intestinales pour créer des pores ou canaux ioniques. La dégradation protéolytique de la protoxine dans l'intestin des insectes est réalisée sous l'action conjuguée du pH alcalin et des protéases à sites sérines (essentiellement la trypsine) du suc digestif (Schnepf *et al.*, 1998).

Les toxines Cry sont constituées de trois domaines structuraux, le domaine I, le domaine II et le domaine III. Le domaine I occupe environ la moitié N-terminale de la toxine activée. Les domaines II et III occupent environ chacun un quart de la toxine activée. Le domaine III est situé à l'extrémité C-terminale de la toxine activée. Chaque domaine de la protéine Cry possède sa propre structure et sa propre fonction.

Le domaine I est constitué de sept hélices alpha, 6 hélices amphiphiles et une hélice hydrophobe, reliées entre-elles par des boucles interhélices constituées de quelques acides aminés. Ce domaine est le domaine transmembranaire, responsable de la formation du pore ou canal ionique (Aronson *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1993 ; Manoj-Kumar et Aronson, 1999 ; Masson *et al.*, 1999 ; Rang *et al.*, 1999 ; Coux *et al.*, 1999). La formation du pore transmembranaire par les hélices alpha du domaine I implique en fait quatre protéines Cry formant un pore complet avec leurs quatre hélices alpha 4 respectives (Masson *et al.*, 1999). Il se forme donc un pore cylindrique de quatre hélices α 4. L'intérieur de ce pore est constitué par les faces hydrophiles des hélices amphiphiles, les résidus chargés négativement étant présents sur les faces hydrophiles, ils se retrouvent dans la lumière du pore, en milieu aqueux et remplissent leur fonction de transport d'ions. L'extérieur du pore est constitué par les faces hydrophobes qui ancrent le pore dans la membrane lipidique. La formation du pore par les hélices α du domaine I implique donc des relations structure-fonction très fortes et des changements de conformation au cours du temps. L'introduction de mutations dans les hélices alpha du domaine I présente donc une forte probabilité de perturbation de la fonction de ce domaine, et donc de l'activité de la toxine.

Les domaines II et III de la toxine activée sont constitués de feuillets béta, eux aussi sous une forme très compactée. Ces deux domaines sont impliqués dans la reconnaissance du site récepteur (spécificité) et dans la stabilité de la toxine (Abdul-Rauf et Ellar, 1999 ; Dean *et al.*, 1996 ; Hussain *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1999 ; Rajamohan *et al.*, 1996, 1998 ; Wu et Dean, 1996). Des échanges de domaines III induisent des changements de spécificité (de Maagd *et al.*, 1999) . Cette région est beaucoup moins conservée, donc plus variable que le domaine I. Elle est impliquée dans la spécificité de chaque toxine. Cette variabilité et ces interactions propres à chaque toxine interviennent dans la nature du spectre d'hôtes très spécifique de chaque toxine et sont impliqués dans la reconnaissance de sites récepteurs différents. La reconnaissance du récepteur est effectuée par des boucles du domaine II et du domaine III et la conformation de ces boucles varie subtilement d'une toxine à l'autre en fonction de l'arrangement et des interactions entre les domaines II et III. Le domaine I interfère aussi avec les deux autres domaines et influence la conformation générale (Rang *et al.*, 1999, 2001). En outre, très peu de choses sont connues sur les relations structure-fonction au sein de ces deux domaines et aucune information n'est actuellement disponible sur la conformation nécessaire à la reconnaissance d'un site récepteur. Il est donc très difficile de présager des conséquences de l'introduction de modifications dans les domaines II et III sur la spécificité, la capacité à reconnaître les sites récepteurs et la toxicité des protéines Cry. Par ailleurs, on sait que des mutations générées dans les domaines II et III induisent très souvent une déstabilisation de la toxine chez l'insecte, entraînant une perte de toxicité.

Des ponts salins existent également entre les domaines I et II des protéines Cry. Ces ponts jouent un rôle important dans la stabilité de la toxine et dans son fonctionnement. L'élimination artificielle de ces ponts chez Cry1Aa1 montre que les protoxines et toxines activées sont moins stables que la protéine parentale (Vachon *et al.*, 2000). Ces ponts salins sont présents entre le domaine II et l'hélice $\alpha 7$ du domaine I. L'importance reconnue de ces ponts laisse supposer que des mutations dans le domaine II et l'hélice $\alpha 7$ du domaine I présentent un risque élevé de perturbation du fonctionnement des protéines Cry.

Description

La présente invention concerne une protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel.

Par protéine Cry, on entend la protéine insecticide produite par une souche de bactérie *Bacillus thuringiensis* (ci après désignée *Bt*), dont les différents holotypes existants et à venir sont référencés par le comité de classification de *Bt* (Crickmore, 2001) et accessibles sur le site Internet http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. En particulier, cette protéine Cry est codée par un gène *cry*, soit naturellement par la bactérie *Bt*, soit de manière recombinante dans un organisme hôte transformé avec un gène *cry* ou avec un gène comprenant au moins la séquence codante d'une protéine Cry. Les protéines Cry selon l'invention comprennent également des protéines Cry dont la séquence a été artificiellement modifiée de manière à augmenter leur activité insecticide ou leur résistance aux conditions de traitement. Cette définition inclut également des fragments de protéines Cry conservant l'activité insecticide, telles que les protéines Cry tronquées ne comportant que la partie N-terminale d'une protéine Cry complète, en particulier le domaine I de cette protéine (WO 94/05771). Sont également comprises les protéines Cry fusionnées telles que décrites dans la demande de brevet internationale WO 94/24264. De manière préférée, la protéine Cry selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20. De manière préférentielle, il s'agit de la protéine Cry9C, et de préférence la protéine Cry9Ca1 (Lambert et al., Appl. Environm. Microbiol. 62, 80-86; WO 94/05771). En particulier, la présente invention s'adapte également à toute protéine Cry dont la toxicité a été améliorée, comme par exemple celles décrites dans les demandes de brevets WO 97/49814 ou WO 99/00407.

Selon la présente invention, la protéine Cry est modifiée. On entend par protéine Cry modifiée, une protéine Cry dont la séquence peptidique est différente de la séquence de la protéine Cry native dont elle est issue. Cette différence de séquences est le résultat de modifications artificielles introduites par ingénierie génétique, notamment l'insertion ou la substitution de résidus acides aminés spécifiques dans ladite séquence peptidique. En particulier, la protéine Cry modifiée est produite par modification de la séquence nucléotidique la codant, notamment par la technique de mutagenèse dirigée bien connue de l'homme du métier (Hutchinson C.A et al., 1978, J. Biol. Chem. 253: 6551). De manière préférée, la modification de la protéine Cry consiste en une substitution de résidus acides aminés.

La protéine Cry modifiée selon l'invention est sensible à la pepsine. La pepsine focalise son action protéolytique au niveau de sites de coupure spécifiques constitués par les acides aminés leucine, phénylalanine et l'acide glutamique. La protéolyse est réalisée du côté C-terminal du résidu concerné. Par sensible à la pepsine, on entend selon l'invention la propriété pour la protéine Cry modifiée de subir une protéolyse par la pepsine. La protéolyse de la protéine Cry conduit à la perte partielle ou totale de l'activité insecticide de ladite protéine. La sensibilité à la pepsine peut donc se mesurer par mise en contact, de préférence *in vitro*, d'une protéine Cry modifiée selon l'invention avec une pepsine, puis mesure de la perte d'activité insecticide de ladite protéine Cry modifiée en comparaison avec une protéine Cry native, non modifiée selon l'invention. A titre d'exemple, les tests décrits dans les exemples 7 et 8 peuvent être employés pour mesurer la sensibilité à la pepsine d'une protéine Cry selon l'invention. Alternativement, la technique du Western blot peut également être utilisée pour mesurer ladite sensibilité à la pepsine. Par cette technique, la sensibilité est mesurée par l'observation de la dégradation structurelle de la protéine Cry modifiée après contact avec une pepsine. Cette observation consiste en la disparition ou l'atténuation d'intensité d'une bande correspondant à la protéine Cry sur une membrane de transfert d'un gel d'électrophorèse par rapport à une protéine Cry native, non modifiée selon l'invention. La mise en œuvre de ces techniques fait partie des connaissances générales de l'homme du métier.

La protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel. Par "site de coupure par la pepsine", on entend un site constitué d'au moins un résidu acide aminé reconnu comme site de protéolyse par la pepsine. Les résidus acides aminés reconnus par la pepsine sont la leucine, phénylalanine ou l'acide glutamique. Par "site de coupure par la pepsine additionnel", on entend un site de coupure supplémentaire par rapport à la protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*.

De manière préférée, le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé sélectionné parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée possède plusieurs sites de coupure par la pepsine additionnels représentés par un même résidu acide aminé. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée possède plusieurs sites de coupure par la pepsine additionnels représentés par des résidus acides aminés différents.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I. Par boucles inter-hélices alpha du domaine I", on entend les chaînes peptidiques reliant les sept hélices alpha du domaine I des protéines Cry telles que décrites dans Grochulski et al. (1995) et Li et al. (1991). Selon l'invention, la protéine Cry doit posséder au moins un site de coupure par la pepsine additionnel. En outre, ledit site de coupure additionnel se trouve dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I. Le terme additionnel s'entend donc comme supplémentaire par rapport au nombre de sites de coupure par la pepsine naturellement présents dans les boucles inter-hélices alpha du domaine I de la protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*. Cette définition signifie que la protéine Cry modifiée selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle possède un nombre de sites de coupure par la pepsine dans ses boucles inter-hélices alpha du domaine I supérieur au nombre de ces sites dans la même protéine Cry native telle que produite par la bactérie *Bt*, la différence entre lesdits nombres étant au minimum égale à 1.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine Cry modifiée selon l'invention possède au moins un site de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la protéine Cry modifiée est une protéine Cry9C modifiée. De préférence, la protéine Cry modifiée est une protéine Cry9Ca1 modifiée, possédant un site de coupure par la pepsine positionné sur le résidu acide aminé 164. En particulier, le résidu arginine naturellement présent en position 164 sur la protéine Cry9Ca1 est remplacé par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique sur la protéine Cry9Ca1 modifiée selon l'invention. De manière préférée, la protéine Cry9Ca1 modifiée selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry dont les séquences sont représentées par les identificateurs SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8.

La présente invention concerne également une protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels qu'elle possède sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine. De préférence, le taux de substitution que possède ladite protéine Cry modifiée est de 25%. Par taux de substitution, on entend le pourcentage de

résidus acides aminés de la protéine Cry native qui sont remplacés par des résidus acides aminés correspondant à des sites de coupure par la pepsine dans la protéine Cry modifiée de l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que l'on introduit au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans lesdites protéines Cry. Par "augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry", on entend un accroissement de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry obtenues par ledit procédé par rapport aux protéines Cry natives correspondantes, cet accroissement se traduisant par une destruction protéolytique et une perte d'activité insecticide des protéines Cry, ces effets pouvant être partiels ou totaux.

L'introduction d'au moins un site de coupure par la pepsine est réalisée de manière artificielle par ingénierie génétique. En particulier, il s'agit d'une insertion ou d'une substitution de résidus acide aminés. De préférence, il s'agit d'une substitution. Une telle substitution peut aisément être réalisée par la technique de mutagenèse dirigée bien connue de l'homme du métier.

De manière préférée, la protéine Cry auquel s'applique le procédé selon l'invention est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20. De manière préférentielle, il s'agit de la protéine Cry9C, et de préférence la protéine Cry9Ca1.

En particulier, le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I de ladite protéine Cry.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, le présent procédé s'applique à une protéine Cry9C. De préférence, il s'applique à une protéine Cry9Ca1, et le site de coupure par la pepsine additionnel est introduit par substitution du résidu acide aminé 164. En particulier, le

résidu arginine naturellement présent en position 164 sur la protéine Cry9Ca1 est remplacé par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique.

La présente invention concerne également un procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine.

De manière préférée, le taux de substitution introduit dans ladite protéine Cry est de 25 %.

La présente invention concerne également un polynucléotide codant pour une protéine Cry modifiée selon l'invention. Selon la présente invention, on entend par "polynucléotide" une séquence nucléotidique naturelle ou artificielle pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

La présente invention concerne également un gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide codant pour une protéine Cry modifiée selon l'invention, et un élément terminateur fonctionnel dans ce même organisme hôte. Les différents éléments qu'un gène chimère peut contenir sont, d'une part, des éléments régulateurs de la transcription, de la traduction et de la maturation des protéines, tels qu'un promoteur, une séquence codant pour un peptide signal ou un peptide de transit, ou un élément terminateur constituant un signal de polyadénylation, et d'autre part un polynucléotide codant pour une protéine. L'expression "liés entre eux de manière opérationnelle" signifie que lesdits éléments du gène chimère sont liés entre eux de manière à ce que le fonctionnement d'un de ces éléments est affecté par celui d'un autre. A titre d'exemple, un promoteur est lié de manière opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'affecter l'expression de ladite séquence codante. La construction du gène chimère selon l'invention et l'assemblage de ses différents éléments est réalisable par l'emploi de techniques bien connues de l'homme du métier, notamment celles décrites dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Le choix des éléments régulateurs constituant le gène chimère est essentiellement fonction de l'espèce hôte dans laquelle ils doivent fonctionner, et l'homme du métier est capable de sélectionner des éléments régulateurs fonctionnels dans un organisme hôte donné. Par "fonctionnels", on entend capables de fonctionner dans un organisme hôte donné.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le gène chimère contient un promoteur dit "constitutif". Un promoteur constitutif selon la présente invention est un promoteur qui induit l'expression d'une séquence codante dans tous les tissus d'un organisme hôte et en permanence, c'est-à-dire durant toute la durée du cycle vital dudit organisme hôte. Certains de ces promoteurs peuvent être tissu-spécifiques, c'est-à-dire exprimer la séquence codante en permanence, mais uniquement dans un tissu particulier de l'organisme hôte. Des promoteurs constitutifs peuvent provenir de tout type d'organisme. Parmi les promoteurs constitutifs qui peuvent être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple, des promoteurs bactériens, comme celui du gène de l'octopine synthase ou celui du gène de la nopaline synthase, des promoteurs viraux, comme celui du gène contrôlant la transcription des ARN19S ou 35S du virus de la mosaïque du Choux-Fleur (Odell et al., 1985, *Nature*, 313, 810-812), ou les promoteurs du virus de la mosaïque de la nervure du Manioc (tels que décrits dans la demande de brevet WO 97/48819). Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera le promoteur du gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO), le promoteur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698, le promoteur du gène EF1-alpha (WO 90/02172), le promoteur d'un gène d'actine (US 5,641,876), ou le promoteur d'un gène d'ubiquitine (EP 0342926).

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le gène chimère contient un promoteur inductible. Un promoteur inductible est un promoteur qui ne fonctionne, c'est-à-dire qui n'induit l'expression d'une séquence codante, que lorsqu'il est lui-même induit par un agent inducteur. Cet agent inducteur est en général une substance qui peut être synthétisée dans l'organisme hôte suite à un stimulus externe audit organisme, ce stimulus externe pouvant être de nature physique ou chimique, biotique ou abiotique. De tels promoteurs sont connus, comme par exemple le promoteur du gène d'*O*-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante décrit dans la demande de brevet WO 00/56897, le promoteur PR-I d'*Arabidopsis* (Lebel et al., 1998, *Plant J.* 16(2):223-233), le promoteur EAS4 du gène de la sesquiterpène synthase du Tabac (Yin et al., 1997, *Plant Physiol.* 115(2), 437-451), ou le promoteur du gène codant la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (Nelson et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 25(3):401-412).

Parmi les éléments terminateurs pouvant être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple l'élément terminateur *nos* du gène codant la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983, *Nucleic Acids Res.* 11(2), 369-385), ou l'élément terminateur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le promoteur et l'élément terminateur du gène chimère selon l'invention sont tous les deux fonctionnels dans les plantes.

Il apparaît également important que le gène chimère comprenne aussi un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la protéine Cry de manière spécifique dans un compartiment cellulaire de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, un compartiment particulier du cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires, par exemple les chloroplastes, ou dans la matrice extracellulaire.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles. Les peptides de transit doubles sont éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est-à-dire qu'ils comprennent, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. De tels peptides de transit doubles sont par exemple décrits dans la demande de brevet EP 0 508 909.

Comme peptide signal utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac décrit par Cornelissen et al. (1987, Nucleic Acid Res. 15, 6799-6811) en particulier lorsque le gène chimère selon l'invention est introduit dans des cellules végétales ou des plantes.

La présente invention concerne également un vecteur contenant un gène chimère selon l'invention. Un tel vecteur est utile pour transformer un organisme hôte et exprimer dans celui-ci une protéine Cry modifiée selon l'invention. Ce vecteur peut être un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus. De manière générale, les principales qualités de ce vecteur doivent être une capacité à se maintenir et à s'autorépliquer dans les cellules de l'organisme hôte, notamment grâce à la présence d'une origine de répllication, et à y exprimer une protéine Cry modifiée. Le choix d'un tel vecteur ainsi que les techniques d'insertion dans celui-ci du gène chimère selon l'invention sont largement décrits dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) et font partie des connaissances générales de l'homme du métier. Le vecteur utilisé dans la présente

invention peut également contenir, en plus du gène chimère de l'invention, un gène chimère contenant un marqueur de sélection. Ce marqueur de sélection permet de sélectionner les organismes hôtes effectivement transformés, c'est-à-dire ceux ayant incorporé le vecteur. Parmi les marqueurs de sélection utilisables dans de nombreux organismes hôtes, on peut citer des marqueurs contenant des gènes de résistance aux antibiotiques tel que celui du gène de l'hygromycine phosphotransférase (Gritz et al., 1983, Gene 25:179-188). De manière préférentielle, l'organisme hôte à transformer est une plante. Parmi les marqueurs de sélection utilisables dans les plantes, on peut citer des marqueurs contenant des gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On peut également citer des gènes codant pour des enzymes facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également des organismes hôtes transformés par un vecteur tel que décrit ci-dessus. Par organismes hôtes, on entend tout type d'organismes, en particulier des plantes ou des microorganismes tels que les bactéries, les virus, les champignons ou les levures. On entend par "organisme hôte transformé", un organisme hôte qui a incorporé dans son génome le gène chimère de l'invention, et produit en conséquence une protéine Cry modifiée selon l'invention dans ses tissus. Pour obtenir les organismes hôtes selon l'invention, l'homme du métier peut utiliser une des nombreuses méthodes de transformation connues. Une de ces méthodes consiste à mettre les cellules à transformer en présence de polyéthylène glycol (PEG) et des vecteurs de l'invention (Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, Biochimie 70(4), 503-517). L'électroporation est une autre méthode qui consiste à soumettre les cellules ou tissus à transformer et les vecteurs de l'invention à un champ électrique (Andreason and Evans, 1988, Biotechniques 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62). Une autre méthode consiste à directement injecter les vecteurs dans les cellules ou les tissus hôtes par micro-injection (Gordon and Ruddle, 1985, Gene 33(2), 121-136). De manière avantageuse, la méthode dite de "biolistique" pourra être utilisée. Elle consiste à bombarder des cellules ou des tissus avec des particules sur lesquelles sont adsorbés les vecteurs de l'invention (Bruce et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24), 9692-9696; Klein et al., 1992, Biotechnology 10(3), 286-291; US Patent No. 4,945,050). De manière préférentielle, la transformation de plantes se fera à l'aide de bactéries du

genre *Agrobacterium*, de préférence par infection des cellules ou tissus desdites plantes par *A. tumefaciens* (Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6, 143-173; Shaw et al., 1983, Gene 23(3):315-330) ou *A. rhizogenes* (Bevan et Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16:357-384; Tepfer and Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28). De manière préférentielle, la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al. (1996, Nat. Biotechnol. 14(6), 745-750).

Ces différentes techniques sont notamment décrites dans les brevets et demandes de brevets suivants : US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 270 615, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également un procédé de production des protéines Cry modifiées selon l'invention. Ce procédé comprend au moins les étapes de:

- (a) mise en culture d'un organisme hôte transformé selon l'invention dans un milieu de culture adapté à la croissance et à la multiplication dudit organisme
- (b) extraction des protéines Cry produites par l'organisme transformé cultivé à l'étape (a)

Selon l'organisme hôte choisi pour mettre en œuvre ce procédé et selon le gène chimère qu'il contient, les protéines Cry produites sont soit produites dans l'organisme hôte, soit sécrétées dans le milieu de culture. Il s'ensuit que l'extraction prévue à l'étape (b) peut nécessiter une étape de destruction des microorganismes, ou au moins des cellules les composant, afin de libérer les protéines Cry si celles-ci ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture. L'étape d'extraction commune aux deux possibilités (protéines sécrétées ou non) consiste en une élimination des organismes hôtes ou débris de ces organismes par filtration ou centrifugation du milieu de culture.

Selon un mode de réalisation particulier, ce procédé de production des protéines Cry modifiées peut également comprendre une étape supplémentaire (c) de purification des protéines Cry produites à partir du milieu de culture.

Selon un mode de réalisation préféré, l'organisme hôte est un microorganisme. De manière préférentielle, l'organisme hôte est une bactérie *Bacillus thuringiensis* et la culture mise en œuvre à l'étape (a) est poursuivie jusqu'à la phase de sporulation desdites bactéries.

La présente invention comprend également des plantes transformées avec un vecteur selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles contiennent un gène chimère selon l'invention intégré de manière stable dans leur génome, et expriment une protéine Cry modifiée dans leurs tissus. L'invention s'étend également aux parties de ces plantes, et la descendance de ces plantes. On entend par "partie de ces plantes", tout organe de ces plantes, qu'il soit aérien ou souterrain. Les organes aériens sont les tiges, les feuilles, les fleurs. Les organes souterrains sont principalement les racines, mais ils peuvent également être des tubercules. Par "descendance", on entend principalement les graines contenant les embryons issus de la reproduction de ces plantes entre-elles. Par extension, le terme "descendance" s'applique à toutes les plantes et graines formées à chaque nouvelle génération issues de croisements entre une plante, en particulier une variété végétale, et une plante transformée selon l'invention.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent être des monocotylédones ou des dicotylédones. De préférence, ces plantes sont des plantes d'intérêt agronomique. De manière avantageuse, les plantes monocotylédones sont le blé, le maïs, le riz. De manière avantageuse, les plantes dicotylédones sont le colza, le soja, le tabac, le coton.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les plantes transformées selon l'invention contiennent, en plus d'un gène chimère selon l'invention, au moins un autre gène contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt. Parmi les polynucléotides codant pour une protéine d'intérêt, on peut citer des polynucléotides codant une enzyme de résistance à un herbicide, par exemple le polynucléotide codant pour l'enzyme *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le polynucléotide codant pour l'enzyme EPSPS (US 5,188,642; WO 97/04103) pour la tolérance au glyphosate ou encore le polynucléotide codant pour l'enzyme HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. Peuvent également être contenus dans ces plantes des polynucléotides de résistance aux maladies, par exemple un polynucléotide codant pour l'enzyme oxalate oxydase tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 531 498 ou le brevet US 5,866,778, ou un polynucléotide codant pour un peptide antibactérien et/ou antifongique tels que ceux décrits dans les demandes de brevets WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053, et WO99/91089. On peut également citer des polynucléotides codant pour des caractères agronomiques de la plante, en

particulier un polynucléotide codant pour une enzyme delta-6 désaturase tel que décrit dans les brevets US 5,552,306, US 5,614,313, et demandes de brevets WO 98/46763 et WO 98/46764, ou un polynucléotide codant pour une enzyme sérine acétyltransférase (SAT) tel que décrit dans les demandes de brevets WO 00/01833 et PCT/FR 99/03179. Les plantes transformées selon l'invention peuvent également contenir un polynucléotide codant pour une autre toxine insecticide, par exemple un polynucléotide codant pour une autre protéine Cry de *Bacillus thuringiensis* (pour exemple, voir la demande de brevet internationale WO 98/40490).

La présente invention a également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre une protéine Cry modifiée selon l'invention, ou un fragment de celle-ci. Les techniques de production d'anticorps sont largement décrites dans la littérature générale et dans des ouvrages de référence tels que Immunological Techniques Made Easy (1998, O. Cochet, J.-L. Teillaud, C. Sautès eds, John Wiley & Sons, Chichester). De préférence, les anticorps selon l'invention sont mis en œuvre dans des tests, ou kits, de détection des protéines Cry selon l'invention.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1 : Création d'un site de coupure par la pepsine au niveau de l'acide aminé 164 de la toxine Cry9Ca1

L'introduction d'un site spécifique à la pepsine dans la toxine Cry9Ca1 de *Bacillus thuringiensis* est réalisée par substitution de l'arginine naturellement présente en position 164 chez cette toxine par l'un des trois acides aminés reconnus par la pepsine : leucine, phénylalanine ou acide glutamique. L'acide aminé 164 est présent au niveau de la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et alpha 4 du domaine I (ci-après boucle inter-hélice alpha3-alpha4).

La séquence native de la boucle inter-hélice alpha3-alpha4 est comprise entre l'acide aspartique 159 et la valine 168. La séquence de cette boucle est la suivante : DRNDTRNLSV. Cette séquence d'acides aminés correspond à la séquence ADN suivante s'étendant de la base 475 à la base 504 :

GAT CGA AAT GAT ACA CGA AAT TTA AGT GTT
Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val

Le codon 164 (CGA) codant pour l'arginine est modifié en codon codant soit pour la leucine, soit pour la phénylalanine ou soit pour l'acide glutamique. Les possibilités de codons sont les suivantes :

Leucine : TTA, TTG, CTT, CTC, CTA ou CTG

Phénylalanine : TTT ou TTC

Acide Glutamique : GAA ou GAG

Le choix des codons préférentiels lors de la mutagenèse dirigée dépend de l'organisme dans lequel le gène *cry* modifié doit être exprimé et varie donc en conséquence. Ce choix fait partie des connaissances générales de l'homme du métier qui adaptera les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi. Dans cet exemple, l'organisme d'expression choisi est la bactérie *B. thuringiensis*. Les codons préférentiellement utilisés par *B. thuringiensis* pour coder la leucine, la phénylalanine ou l'acide glutamique sont, respectivement, TTA (leucine), TTT (phénylalanine) et GAA (acide glutamique).

La modification pour expression chez *Bt* peut donc être réalisée en utilisant les oligonucléotides de mutagenèses suivants (dans les oligonucléotides décrits dans les exemples ci-après, le codon en lettres majuscules correspond au codon muté, et les bases et acides aminés en caractères gras correspondent aux bases et acides aminés spécifiquement mutés):

Oligonucléotide n° 1 : 5' - gat cga aat gat aca **TTA** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Leu** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°1 permet le remplacement de l'arginine 164 par une leucine

Oligonucléotide n° 2 : 5' - gat cga aat gat aca **TTT** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Phe** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°2 permet le remplacement de l'arginine 164 par une phénylalanine

Oligonucléotide n° 3 : 5' - gat cga aat gat aca **GAA** aat tta agt gtt gtt - 3'
Asp Arg Asn Asp Thr **Glu** Asn Leu Ser Val Val

L'oligonucléotide n°3 permet le remplacement de l'arginine 164 par un acide glutamique

Les caractéristiques des souches bactériennes de *Escherichia coli* utilisées pour la modification de la séquence du gène *cry9Ca1* sont les suivantes :

- JM 109 de génotype *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiD (lac-proAB) F'* (*traD36 proAB+ lacI^q lacZ DM15*)

- BMH 71-18 mut S de génotype *thi, supE, Δ(lac-proAB), (mutS::Tn10)(F', proAB, lacI^qZΔM15)*.

L'ADN plasmidique est préparé par minipréparation selon la technique de la lyse alcaline (Birboim and Doly, 1979). Chaque colonie bactérienne est cultivée dans 2 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37 °C avec agitation (200 rpm). La culture est ensuite transférée dans un microtube puis centrifugée à 13500 g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les bactéries sont resuspendues dans 100 µl d'une solution de 25mM Tris-HCl, pH 8, 10mM EDTA contenant de la Rnase A à la concentration finale de 100 µg/ml. 200 µl d'une solution de NaOH 0,2M, 1% SDS sont rajoutés et la suspension est mélangée deux fois par inversion du microtube. 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 2,55 M, pH 4,5 sont rajoutés et la suspension est incubée 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 13500 g, le surnageant est transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol froid. Après une centrifugation de 30 min à 13500 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot contenant l'ADN est séché quelques minutes sous vide puis repris dans 50 µl d'eau distillée stérile. Les échantillons sont ensuite placés à 65°C pendant 30 min.

Les digestions par endonucléases de restriction sont réalisées pour 1 µg d'ADN dans un volume final de 20 µl en présence d'un dixième de volume final de tampon 10X conseillé par le fournisseur pour chaque enzyme et à l'aide de 5 unités d'enzyme. La réaction est incubée pendant 2 à 3 h à la température optimale pour l'enzyme.

La déphosphorylation des extrémités 5' engendrées par une enzyme de restriction est réalisée avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La réaction se fait en utilisant 5 µl de tampon de déphosphorylation 10X (500 mM Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 10 mM spermidine) et une unité d'enzyme par µg d'ADN dans un volume final de 50 µl. La réaction est incubée pendant une heure à 37°C dans le cas d'extrémités 5' sortantes ou à 55°C dans le cas d'extrémités franches ou 3' sortantes. Après la déphosphorylation, l'enzyme est ensuite inactivée pendant 30 min à 65°C puis éliminée avec deux extractions volume à volume avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Les ligatures se font à l'aide de l'ADN ligase du phage T4. Elles sont réalisées avec une quantité de vecteur égale à 100 ng et un rapport molaire insert/vecteur compris entre 5 et 10. Le volume final de la réaction est de 30 µl et

comprend 3 µl de tampon de ligature 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 3 unités d'enzyme. La réaction est incubée une nuit à 14°C.

Les oligonucléotides de mutagenèse (oligonucléotide n°1, oligonucléotide n°2 et oligonucléotide n°3) sont phosphorylés en 5' afin de permettre la ligature. 100 pmoles d'oligonucléotide sont incubés 30 min à 37°C avec 5 unités de T4 polynucléotide kinase dans un volume final de 25 µl en présence de 2,5 µl de tampon 10X de phosphorylation (700 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT) en présence d'ATP à la concentration finale de 1mM. L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 10 min.

La mutagenèse dirigée est conduite selon une méthode classique décrite ci-après. D'autres procédures connues des experts de l'art sont décrites dans la littérature et donnent des résultats identiques. La méthode de mutagenèse dirigée utilisée est celle décrite par le fabricant pour l'usage du système Altered Sites II commercialisé par la société Promega. Une description détaillée du système de mutagenèse et du protocole peut être trouvée sur le site internet de la société Promega à l'adresse <http://www.promega.com>. Le gène *cry9Cal* est préalablement cloné dans un phagemide pAlter-1 (Promega) portant le gène de résistance à la tétracycline et le gène de résistance à l'ampicilline contenant une mutation ponctuelle. Le fragment d'ADN à muter est au préalable cloné dans le plasmide pAlter-1. 0.5 pmol d'ADN plasmidique sont dénaturés en rajoutant 2 µl de NaOH 2M, 2 mM EDTA dans un volume final de 20 µl et en incubant 5 min à température ambiante. 2 µl d'acétate d'ammonium 2M, pH 4,6 et 75 µl d'éthanol sont rajoutés et le mélange est incubé à -70°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 14000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est ensuite rincé avec 200 µl d'éthanol 70% et recentrifugé à 14000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ADN dénaturé est alors séché sous vide et resuspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile. 10 µl d'ADN dénaturé c'est-à-dire 0,05 pmol sont mélangés avec 0.25 pmol d'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à l'ampicilline phosphorylé, 0.25 pmol d'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à la tétracycline et 1.25 pmol d'oligonucléotide de mutagenèse (oligonucléotide n°1, n°2 ou n°3) phosphorylé en présence de tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) et incubés à 75°C pendant 5 min puis refroidis lentement jusqu'à température ambiante. 5 µl d'eau distillée stérile, 3 µl de tampon de synthèse 10x (100 mM Tris-HCl, pH7,5, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5mM dNTP), 10 unités d'ADN polymérase T4 et 3 unités d'ADN ligase T4 sont rajoutés et la réaction est incubée 90 min à 37°C. 200 µl de bactéries compétentes *E. coli* BMH 71-18 sont alors incubées en présence de 1,5 µl de la réaction précédente dans de la glace pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite effectué en plaçant les bactéries 50 sec à 42°C puis 2 min dans la glace. 900 µl de milieu LB sont ensuite rajoutés et la suspension est incubée à 37°C pendant

une heure sous agitation. 4 ml de milieu LB additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml sont alors rajoutés et la culture est incubée une nuit à 37°C sous agitation. Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée à partir des 4 ml de culture selon le protocole d'extraction d'ADN plasmidique décrit précédemment. 200 µl de bactéries compétentes *E. coli* JM109 sont alors incubées en présence de 1 ng d'ADN plasmidique dans de la glace pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite effectué en plaçant les bactéries 50 sec. à 42°C puis 2 min. dans la glace. 900 µl de milieu LB sont ensuite rajoutés et la suspension est incubée à 37°C pendant une heure sous agitation. 100 µl de suspension bactérienne sont ensuite étalés sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml. Les recombinants obtenus sont criblés pour trouver le clone d'intérêt. Cette recherche est effectuée en isolant l'ADN plasmidique de plusieurs colonies par la technique de minipréparation décrite précédemment puis par séquençage de cet ADN. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné de tétracycline à la concentration finale de 12,5 µg/ml. La justesse de la mutation souhaitée et la vérification de l'absence de mutations indésirables sont contrôlées par séquençage de l'ADN après mutagenèse dirigée. Des échantillons d'ADN pour le séquençage sont purifiés avec le Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) selon la procédure recommandée par le fournisseur et le séquençage est réalisé sur un séquenceur automatique ABI 377 (Perkin-Elmer) à partir de réactions de séquençage conduite selon la méthode de terminaison de chaîne (Sanger *et al.*, 1977), par PCR en utilisant le système ABI PRISM BigDye terminator Cycle Sequencing Kit. Pour la réalisation des réactions de séquençage et l'analyse automatique des échantillons, les procédures utilisées sont celles recommandées par le fournisseur (Applied Biosystems).

Exemple 2 : Création de sites de coupure par la pepsine au niveau de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 de la toxine Cry9Ca1

L'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha3-alpha4 de la toxine Cry9Ca1 est réalisée par substitution d'au moins un acide aminé de cette boucle inter-hélice par un acide aminé reconnu par la pepsine, à savoir la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique. Des codons codant pour ces trois acides aminés seront donc créés en place des codons naturellement présents dans la région s'étendant de la base 475 à la base 504. Les possibilités de codons pour ces trois acides aminés sont décrites dans l'Exemple 1.

Comme dans l'Exemple 1, l'organisme de production de la protéine Cry modifiée choisi est la bactérie *B. thuringiensis*, et le choix des codons de remplacement est donc identique à celui de l'Exemple 1. En outre, si un autre organisme de production est choisi, l'homme du métier

saura adapter les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi.

Diverses séquences alternatives pour la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 sont possibles, chacune possédant un nombre variable de résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Certaines de ces possibilités sont présentées dans le tableau 1. Les possibilités de modification de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 ne sont pas limitées à celles présentées dans le tableau 1 ci-dessous. La liste présentée dans le tableau 1 a pour objectif d'illustrer certaines des possibilités de modification sans limiter la portée de l'invention à ces illustrations. L'homme du métier connaissant les codons spécifiques de chaque acide aminés selon les organismes saura adapter l'enseignement décrit dans cet exemple à toutes les possibilités de modifications de la boucle inter-hélice alpha3-alpha4, en particulier à celles qui ne sont pas décrites dans le tableau 1.

Tableau 1. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 3-alpha 4 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	DRNDTRNLSV	gat cga aat gat aca cga aat tta agt gtt Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val
Mutant n° 1	ELNEFLNLSV	gaA TTa aat gaA TTT TTa aat tta agt gtt Glu Leu Asn Glu Phe Leu Asn Leu Ser Val
Mutant n° 2	ELNELLNLSV	gaA TTa aat gaA TTa TTa aat tta agt gtt Glu Leu Asn Glu Leu Leu Asn Leu Ser Val
Mutant n° 3	ELLEFLLLSV	gaA TTa TTA gaA TTT TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 4	ELLELLLLSV	gaA TTa TTA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 5	ELLEELLLSV	gaA TTa TTA gaA GAa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 6	ERLEFLLLSV	gaA cga TTA gaA TTT TTa TTA tta agt gtt Glu Arg Leu Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 7	ERLELLLLSV	gaA cga TTA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Arg Leu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 8	ERLEELLLSV	gaA TTa GAA gaA TTa TTa TTA tta agt gtt Glu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val
Mutant n° 9	ELLEEEELSV	gaA TTa TTA gaA GAa GAa GAA tta agt gtt Glu Leu Leu Glu Glu Glu Glu Leu Ser Val

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha3-alpha 4 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 1 sont présentés ci-après (numérotés de 4 à 20).

Oligonucléotide n° 4 :	cga aat gat aca cga TTA tta agt gtt gtt cgt Arg Asn Asp Thr Arg Leu Leu Ser Val Val Arg
Oligonucléotide n° 5 :	cga aat gat aca cga GAA tta agt gtt gtt cgt Arg Asn Asp Thr Arg Glu Leu Ser Val Val Arg
Oligonucléotide n° 6 :	ttg gct gat cga aat gaA TTT TTA aat tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Phe Leu Asn Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 7 :	ttg gct gat cga aat gaA TTT TTA tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Phe Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 8 :	ttg gct gat cga aat gaA TTa TTA aat tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Leu Leu Asn Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 9 :	ttg gct gat cga aat gaA TTa TTA tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Leu Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 10 :	ttg gct gat cga aat gaA GAa GAa gaa tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Glu Glu Glu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 11 :	ttg gct gat cga aat gaA GAa TTA tta tta agt gtt gtt Leu Ala Asp Arg Asn Glu Glu Leu Leu Leu Ser Val Val
Oligonucléotide n° 12 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa aat gaa tta tta aat Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Asn Glu Leu Leu Asn
Oligonucléotide n° 13 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa aat gaa ttt tta aat Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Asn Glu Phe Leu Asn
Oligonucléotide n° 14 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa TTA gaa ttt tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Phe Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 15 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa TTA gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 16 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa TTA gaa gaa tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 17 :	caa aat tgg ttg gct gaA cga TTA gaa ttt tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Arg Leu Glu Phe Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 18 :	caa aat tgg ttg gct gaA cga TTA gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Arg Leu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 19 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa gaA gaa tta tta tta tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Glu Glu Leu Leu Leu Leu
Oligonucléotide n° 20 :	caa aat tgg ttg gct gaA TTa TTA gaa gaa gaa gaa tta Gln Asn Trp Leu Ala Glu Leu Leu Glu Glu Glu Glu Leu

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 1. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des exemples de mutants décrits dans le tableau 1, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 1 : La création du mutant n°1 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°6 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 13 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 13 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°6.

Mutant n° 2 : La création du mutant n° 2 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°8 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 12 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 12 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°8.

Mutant n° 3 : La création du mutant n° 3 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 7 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 14 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 7 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 14 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 7.

Mutant n° 4 : La création du mutant n° 4 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 15 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 15 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 5 : La création du mutant n° 5 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 11 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 16 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 11 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 16 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 11.

Mutant n° 6 : La création du mutant n° 6 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 7 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 17 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 7 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 17 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 7.

Mutant n° 7 : La création du mutant n° 7 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 18 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 18 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 8 : La création du mutant n° 8 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°4 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 9 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 19 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 9 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°4 et l'oligonucléotide n° 19 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 4 et n° 9.

Mutant n° 9 : La création du mutant n° 9 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit dans l'exemple 1 en utilisant l'oligonucléotide n°5 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 10 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 20 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 10 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n°5 et l'oligonucléotide n° 20 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 5 et n° 10.

Selon ce protocole, les oligonucléotides sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 4, 5, 6 et 8

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 7, 9, 10, 11, 12 et 13

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20

Le protocole complet de réalisation de ces mutants est identique à celui décrit dans l'Exemple 1. Ce protocole est commun à chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent. Le passage à la mutation suivante s'effectue après le criblage du clone d'intérêt ayant intégré la mutation précédente. Si cette étape est la dernière de la première série ou de la deuxième série de mutagenèse, le matériel issu de cette série d'expérimentations est réutilisé comme matériel initial pour respectivement la deuxième ou la troisième série de mutagenèse en utilisant respectivement les oligonucléotides de 2^{ème} ou de 3^{ème} série. Un deuxième cycle de mutagenèse peut alors être effectué en utilisant l'ADN plasmidique obtenu comme ADN matrice ainsi que l'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à la tétracycline et l'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à l'ampicilline et un oligonucléotide de mutagenèse de 2^{ème} série. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné de tétracycline à la concentration finale de 12,5 µg/ml. Un troisième cycle de mutagenèse peut être réalisé en utilisant l'ADN plasmidique obtenu à l'issue du deuxième cycle de mutagenèse comme ADN matrice ainsi que l'oligonucléotide de réparation du gène de résistance à l'ampicilline et l'oligonucléotide de destruction du gène de résistance à la tétracycline et un oligonucléotide de mutagenèse de 3^{ème} série. La sélection des recombinants se fait alors à l'aide de milieu additionné d'ampicilline à la concentration finale de 100 µg/ml. Après réalisation de toutes les séries de mutagenèse nécessaires à la réalisation d'un mutant, les étapes de contrôles des mutations sont réalisées comme décrites à l'Exemple 1.

Exemple 3 : Création de sites de coupure par la pepsine dans les boucles inter-hélices alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1

Les positions des séquences natives des boucles inter-hélices alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1 sont présentées dans le tableau 2 ci-après. Les séquences nucléotidiques et les positions correspondantes dans le gène *cry9Ca1* sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 2. Position et séquences des boucles inter-hélices $\alpha 4-\alpha 5$, $\alpha 5-\alpha 6$ et $\alpha 6-\alpha 7$ de la toxine Cry9Ca1

Boucle	Séquence	Position
Boucle $\alpha 4-\alpha 5$	FAVNGQQVPLL	Phénylalanine 187 à Leucine 197
Boucle $\alpha 5-\alpha 6$	LFGEWGF	Leucine 216 à Phénylalanine 223
Boucle $\alpha 6-\alpha 7$	LRGTN	Leucine 257 à Asparagine 261

Tableau 3. Position et séquences du gène *cry9Ca1* codant les boucles inter-hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$

Boucle	Séquence	Position
Boucle $\alpha 4$ - $\alpha 5$	TTT GCA GTA AAT GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG	559 - 591
Boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$	CTT TTT GGA GAA GGA TGG GGA TTC	646 - 669
Boucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$	TTA AGA GGA ACA AAT	769- 783

La superposition des séquences nucléotidiques et acides aminés est la suivante :

Boucle $\alpha 4$ -- $\alpha 5$:	TTT GCA GTA AAT GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu leu
Boucle $\alpha 5$ - $\alpha 6$	CTT TTT GGA GAA GGA TGG GGA TTC Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe
Boucle $\alpha 6$ - $\alpha 7$	TTA AGA GGA ACA AAT Leu Arg Gly thr Asn

L'introduction de sites spécifiques à la pepsine dans les boucles inter-hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ ou $\alpha 6$ - $\alpha 7$ de la toxine Cry9Ca1 est réalisée par substitution d'au moins un acide aminé de ces boucles inter-hélices par un acide aminé reconnu par la pepsine, à savoir la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique. Des codons codant pour ces trois acides aminés seront donc créés en place des codons naturellement présents dans la région s'étendant des bases 559 à 591 (boucle inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$), 646 à 669 (boucle inter-hélice $\alpha 5$ - $\alpha 6$), et 769 à 783 (boucle inter-hélice $\alpha 6$ - $\alpha 7$). Les possibilités de codons pour ces trois acides aminés sont décrites dans l'Exemple 1.

Comme dans l'Exemple 1, l'organisme de production de la protéine Cry modifiée choisi est la bactérie *B. thuringiensis*, et le choix des codons de remplacement est donc identique à celui de l'Exemple 1. En outre, si un autre organisme de production est choisi, l'homme du métier saura adapter les codons préférentiels en fonction de l'organisme de production choisi.

Diverses séquences alternatives pour les boucles inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ sont possibles, chacune possédant un nombre variable de résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique. Plusieurs de ces diverses possibilités sont présentées dans les tableaux 4, 5 et 6. Les possibilités de modification des boucles inter-hélice $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ ne sont pas limitées à celles présentées dans les tableaux 4, 5 et 6 ci-dessous. La liste présentée dans les tableaux 4, 5 et 6 a pour objectif d'illustrer certaines des possibilités de modification sans limiter la portée de l'invention à ces illustrations.

L'homme du métier connaissant les codons spécifiques de chaque acide aminé selon les organismes saura adapter l'enseignement décrit dans cet exemple à toutes les possibilités de modifications des boucles inter-hélices alpha4-alpha5, alpha5-alpha6 et alpha6-alpha7, en particulier à celles qui ne sont pas décrites dans les tableaux 4, 5 et 6.

Tableau 4. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 4-alpha 5 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	FAVNGQQVPLL	ttt gca gta aat gga cag cag gtt cca tta ctg Phe Ala Val Asn Gly Gln Gln Val Pro Leu leu
Mutant n° 10	FLLNLFFLPLL	ttt TTa Tta aat TTa TTT TTT TtA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Leu Phe Phe Leu Pro Leu leu
Mutant n° 11	FLLNLEELPLL	ttt TTa Tta aat TTa GaA GaA TtA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu leu
Mutant n° 12	FEENLEELPLL	ttt GAa GAa aat TTa GaA GaA TtA cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu leu
Mutant n° 13	FEENFLLFPLL	ttt GAa GAa aat TTT TTA TTA Ttt cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Phe leu Leu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 14	FEENFEEFPLL	ttt GAa GAa aat TTT GaA GaA Ttt cca tta ctg Phe Glu Glu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 15	FLLNFEEFPLL	ttt TTa TTa aat TTT GaA GaA Ttt cca tta ctg Phe Leu leu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu leu
Mutant n° 16	FLLNEFFEPLL	ttt TTa TTa aat GAa TTT TTT gAA cca tta ctg Phe Leu leu Asn Glu Phe Phe Glu Pro Leu leu

Tableau 5. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 5-alpha 6 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	LFGEWGF	ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe
Mutant n° 17	LFLELFLF	ctt ttt TTa gaa TTa tTT TTa ttc Leu Phe Leu Glu Leu Phe Leu Phe
Mutant n° 18	LFLLLFLF	ctt ttt TTa TTa TTa tTT TTa ttc Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Phe
Mutant n° 19	LFLEEFEL	ctt ttt TTa gaa gAa tTT gAa TTA Leu Phe Leu Glu Glu Phe Glu Leu
Mutant n° 20	LFEEEFEL	ctt ttt gAa gaa gAa tTT gAa TTA Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Leu

Mutant n° 21 LFEEEFEE ctt ttt gAa gaa TTa tTT gAa GAA
 Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Glu

Tableau 6. Exemples de modifications possibles de la boucle inter-hélice alpha 6-alpha 7 de la toxine Cry9Ca1

Protéine	Séquence en acides aminés	Séquence nucléotidique
Cry9Ca1	LRGTN	tta aga gga aca aat Leu Arg Gly thr Asn
Mutant n° 22	LLELN	tta TTa gAa TTa aat Leu Leu Glu Leu Asn
Mutant n° 23	LLFLN	tta TTa TTT TTa aat Leu Leu Phe Leu Asn
Mutant n° 24	LELLN	tta GAa TTa TTa aat Leu Glu Leu Leu Asn
Mutant n° 25	LLFFN	tta TTa TTT TTT aat Leu Leu Phe Phe Asn
Mutant n° 26	LEELN	tta GAa GAa TTa aat Leu Glu Glu Leu Asn
Mutant n° 27	LEFLN	tta GAa TTT TTa aat Leu Glu Phe Leu Asn
Mutant n° 28	LEFEN	tta GAa TTT GAa aat Leu Glu Phe Glu Asn
Mutant n° 29	LEEEN	tta GAa gAa GAa aat Leu Glu Glu Glu Asn

3-1- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha4-alpha 5

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha4-alpha 5 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 4 sont présentés ci-après (numérotés de 21 à 34).

Oligonucléotide n° 21 : gct att cca ttg ttt TTa Tta aat gga cag cag gtt
 Ala Ile Pro Leu Phe Leu leu Asn Gly Gln Gln Val

Oligonucléotide n° 22 : gct att cca ttg ttt GAa GAa aat gga cag cag gtt
 Ala Ile Pro Leu Phe Glu Glu Asn Gly Gln Gln Val

Oligonucléotide n° 23 : tta tta aat gga cag cag TtA cca tta ctg tca gta
 Leu leu Asn Gly Gln Gln Leu Pro Leu Leu Ser Val

Oligonucléotide n° 24 :	tta tta aat gga cag cag Ttt cca tta ctg tca gta Leu leu Asn Gly Gln Gln Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 25 :	tta tta aat gga cag cag gAA cca tta ctg tca gta Leu leu Asn Gly Gln Gln Glu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 26 :	gaa gaa aat gga cag cag TtA cca tta ctg tca gta Glu Glu Asn Gly Gln Gln Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 27 :	gaa gaa aat gga cag cag Ttt cca tta ctg tca gta Glu Glu Asn Gly Gln Gln Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 28 :	cca ttg ttt tta tta aat TTa TTT TTT tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Leu Phe Phe Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 29 :	cca ttg ttt tta tta aat TTa GaA GaA tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 30 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTa GaA GaA tta cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Leu Glu Glu Leu Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 31 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTT TTA TTA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Phe Leu Leu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 32 :	cca ttg ttt gaa gaa aat TTT GaA GaA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Glu Glu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 33 :	cca ttg ttt tta tta aat TTT GaA GaA ttt cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Phe Glu Glu Phe Pro Leu Leu Ser Val
Oligonucléotide n° 34 :	cca ttg ttt tta tta aat GAa TTT TTT gaa cca tta ctg tca gta Pro Leu Phe Leu Leu Asn Glu Phe Phe Glu Pro Leu Leu Ser Val

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 2. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des mutants décrits dans le tableau 4, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 10 : La création du mutant n° 10 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 23 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 28 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 23 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 28 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 23.

Mutant n° 11 : La création du mutant n° 11 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 23 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 29 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 23 est défini pour reconnaître les modifications

apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 29 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 23.

Mutant n° 12 : La création du mutant n° 12 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 26 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 30 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 26 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 30 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 26.

Mutant n° 13 : La création du mutant n° 13 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 27 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 31 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 27 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 31 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 27.

Mutant n° 14 : La création du mutant n° 14 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°22 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 27 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 32 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 27 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 22 et l'oligonucléotide n° 32 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 22 et n° 27.

Mutant n° 15 : La création du mutant n° 15 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 24 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 33 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 24 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 33 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 24.

Mutant n° 16 : La création du mutant n° 16 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°21 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 25 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 34 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 25 est défini pour reconnaître les modifications apportées

lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 21 et l'oligonucléotide n° 34 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 21 et n° 25.

Selon ce protocole, les oligonucléotides destinés à créer les mutants n° 10 à n° 16 décrits dans le tableau 4 sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 21 et 22

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 23, 24, 25, 26 et 27

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 28, 29, 30, 31, 32, 33 et 34

3-2- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha5-alpha 6

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha5-alpha 6 nécessite pour chacun des mutants l'utilisation successive de plusieurs oligonucléotides de mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 5 sont présentés ci-après (numérotés de 35 à 44).

Oligonucléotide n° 35 :	gat gca tct ctt ttt TTa gaa gga tgg gga ttc Asp Ala Ser Leu Phe Leu Glu Gly Trp Gly Phe
Oligonucléotide n° 36 :	gat gca tct ctt ttt TTa TTa gga tgg gga ttc aca Asp Ala Ser Leu Phe Leu Leu Gly Trp Gly Phe Thr
Oligonucléotide n° 37 :	gat gca tct ctt ttt gAa gaa gga tgg gga ttc Asp Ala Ser Leu Phe Glu Glu Gly Trp Gly Phe
Oligonucléotide n° 38 :	tta gaa gga tgg gga TTa aca cag ggg gaa att Leu Glu Gly Trp Gly Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 39 :	gga gaa gga tgg gga GAA aca cag ggg gaa att Gly Glu Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 40 :	gca tct ctt ttt tta gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Glu Leu Phe Leu Phe Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 41 :	gca tct ctt ttt tta tta TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu Phe Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 42 :	gca tct ctt ttt tta gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Leu Glu Glu Phe Glu Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 43 :	gca tct ctt ttt gaa gaa TTa tTT TTa ttc aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Leu Thr Gln Gly Glu Ile
Oligonucléotide n° 44 :	gca tct ctt ttt gaa gaa TTa tTT TTa gaa aca cag ggg gaa att Ala Ser Leu Phe Glu Glu Glu Phe Glu Glu Thr Gln Gly Glu Ile

La procédure de mutagenèses dirigées successives est similaire à la procédure décrite dans l'exemple 2. La seule différence réside dans la combinaison des oligonucléotides. Pour chacun des mutants décrits dans le tableau 5, les combinaisons successives d'oligonucléotides sont décrites ci-après.

Mutant n° 17 : La création du mutant n°17 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 35 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 40 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 40 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 35.

Mutant n° 18 : La création du mutant n° 18 nécessite deux séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole décrit ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 36 lors de la première mutagenèse et l'oligonucléotide n° 41 lors de la seconde. L'oligonucléotide n° 41 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 36.

Mutant n° 19 : La création du mutant n° 19 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 35 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 38 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 42 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 38 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 35 et l'oligonucléotide n° 42 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 35 et n° 38.

Mutant n° 20 : La création du mutant n° 20 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n°37 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 38 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 43 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 38 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 37 et l'oligonucléotide n° 43 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 37 et n° 38.

Mutant n° 21 : La création du mutant n° 21 nécessite trois séries successives de mutagenèses dirigées selon le protocole ci-après en utilisant l'oligonucléotide n° 37 lors de la première mutagenèse, l'oligonucléotide n° 39 lors de la deuxième et l'oligonucléotide n° 44 lors de la troisième. L'oligonucléotide n° 39 est défini pour reconnaître les modifications apportées lors de la première mutagenèse avec l'oligonucléotide n° 37 et l'oligonucléotide n° 44 est défini

pour reconnaître les modifications apportées lors des deux premières mutagenèses avec les oligonucléotides n° 37 et n° 39.

Selon ce protocole, les oligonucléotides destinés à créer les mutants n° 17 à n° 21 décrits dans le tableau 5 sont répartis en trois catégories, oligonucléotides de 1^{ère} série, oligonucléotides de 2^{ème} série et oligonucléotides de 3^{ème} série. Cette répartition est la suivante :

Oligonucléotides de 1^{ère} série : Oligonucléotides n° 35, 36 et 37

Oligonucléotides de 2^{ème} série : Oligonucléotides n° 38, 39, 40 et 41

Oligonucléotides de 3^{ème} série : Oligonucléotides n° 42, 43 et 44

3-3- Création de sites de coupure par la pepsine dans la boucle inter-hélice alpha6-alpha 7

La substitution de plusieurs acides aminés au sein de la boucle inter-hélice alpha 6-alpha 7 ne nécessite pour chacun des mutants qu'une seule mutagenèse. Les oligonucléotides de mutagenèse nécessaires à la création des exemples de mutants présentés dans le tableau 6 sont présentés ci-après (numérotés de 45 à 52).

Oligonucléotide n° 45 : ggt tta gat cgt tta **TTa gAa TTa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Leu Glu Leu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 46 : ggt tta gat cgt tta **TTa TTT TTa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Leu Phe Leu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 47 : ggt tta gat cgt tta **GAa TTa TTa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Glu Leu Leu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 48 : ggt tta gat cgt tta **TTa TTT TTT** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Leu Phe Phe** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 49 : ggt tta gat cgt tta **GAa GAa TTa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Glu Glu Leu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 50 : ggt tta gat cgt tta **GAa TTT TTa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Glu Phe Leu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 51 : ggt tta gat cgt tta **GAa TTT GAa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Glu Phe Glu** Asn Thr Glu Ser Trp

Oligonucléotide n° 52 : ggt tta gat cgt tta **GAa gAa GAa** aat act gaa agt tgg
Gly Leu Asp Arg Leu **Glu Glu Glu** Asn Thr Glu Ser Trp

L'oligonucléotide n° 45 est utilisé pour créer le mutant n° 22.

L'oligonucléotide n° 46 est utilisé pour créer le mutant n° 23.

L'oligonucléotide n° 47 est utilisé pour créer le mutant n° 24.

L'oligonucléotide n° 48 est utilisé pour créer le mutant n° 25.

L'oligonucléotide n° 49 est utilisé pour créer le mutant n° 26.

L'oligonucléotide n° 50 est utilisé pour créer le mutant n° 27.

L'oligonucléotide n° 51 est utilisé pour créer le mutant n° 28.

L'oligonucléotide n° 52 est utilisé pour créer le mutant n° 29.

Le protocole complet de réalisation de ces mutants est identique à celui décrit dans l'Exemple 2. Ce protocole est commun à chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent.

Exemple 4 : Création de sites de coupure par la pepsine au niveau des boucles inter-hélices alpha 3-alpha 4, alpha 4-alpha 5, alpha 5-alpha 6 et alpha 6-alpha 7 de diverses toxines Cry

Plusieurs groupes de protéines Cry présentent des similitudes de structure. Il s'agit notamment des protéines appartenant aux familles Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 ou Cry20. Ces similitudes sont démontrées dans la littérature (Schnepf *et al.*, 1998). D'autres protéines Cry non citées dans la littérature peuvent également présenter des similitudes de structure et de séquence avec ces familles. L'Exemple 4 a pour but de démontrer l'applicabilité de l'enseignement de la présente invention, tel qu'exemplifié sur la protéine Cry9Ca1 dans les Exemples 2 et 3, à toutes ces familles de structures similaires.

Les modifications dans les boucles inter-hélices décrites dans les Exemples 2 et 3 peuvent être réalisées de façon équivalente pour toutes les protéines Cry chez lesquelles on peut identifier des boucles inter-hélices similaires à celles présentes dans le domaine I de la toxine Cry9Ca1. Si la localisation et la séquence de ces boucles inter-hélices sont définies pour ces diverses toxines Cry, il est très facile pour un expert dans l'art de réaliser des modifications similaires à celles présentées dans les exemples 2 et 3 à partir des détails techniques fournis dans ces mêmes exemples 2 et 3. Dans le présent exemple, les éléments sont donnés pour permettre la création de sites spécifiques de dégradation par la pepsine chez les toxines Cry autres que la toxine Cry9Ca1 et notamment les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20. La modification de ces boucles inter-hélices pour créer des sites de dégradation par la pepsine chez les toxines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 ou Cry20 nécessite de suivre les étapes suivantes :

1) Etablir, d'après les séquences et les localisations des boucles inter-hélices présentées dans les tableaux 6 à 13 ci-dessous, des listes de mutants possibles possédant un ou plusieurs résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique comme présenté dans les tableaux 1, 4, 5 et 6 et dans les exemples 2 et 3.

2) Etablir les séquences des gènes mutants en tenant compte de la préférence de codons de l'organisme hôte, et si cet organisme est *B. thuringiensis* en utilisant préférentiellement les codons TTA, TTT et GAA pour la leucine, la phénylalanine et l'acide glutamique, respectivement.

3) Synthétiser des oligonucléotides de mutagenèse pour modifier la séquence des gènes codant pour les toxines sélectionnées sur le modèle de ceux présentés dans les exemples 2 et 3.

4) Utiliser des stratégies de mutagenèses simples ou multiples telles que décrites dans les exemples 2 et 3 et suivant les protocoles expérimentaux décrits en détail dans les exemples 2 et 3.

La localisation des boucles inter-hélices $\alpha 3$ - $\alpha 4$, $\alpha 4$ - $\alpha 5$, $\alpha 5$ - $\alpha 6$ et $\alpha 6$ - $\alpha 7$ du domaine I et leurs séquences sont présentées pour les toxines Cry1, Cry3, Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20 dans les tableaux 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 ci-dessous. Ces séquences sont présentées pour chacune des protéines holotypes telles que définies par le comité de classification de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2001). Toutefois, les homologies de séquences intra-holotypes, c'est-à-dire à entre les différents sous-types d'un même holotype, étant très élevées, l'homme du métier saura adapter l'enseignement du présent Exemple 4 à tous les sous-types de protéines Cry.

Tableau 7. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 3- alpha 4 chez les protéines Cry1

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry1Aa	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Ab	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Ac	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Ad	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Ae	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Af	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369

Cry1Ag	DPTN	120 à 123	gatcctactaat	358 à 369
Cry1Ba	NRDD	139 à 142	aaccgtgatgat	415 à 426
Cry1Bb	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
Cry1Bc	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
Cry1Bd	NRND	144 à 147	aaccgaaatgat	430 à 441
Cry1Ca	DPNN	119 à 122	gatcctaataat	355 à 366
Cry1Cb	DPDN	119 à 122	gatcctgataat	355 à 366
Cry1Da	DPTN	119 à 122	gatcctactaat	355 à 366
Cry1Db	DPSN	119 à 122	gatccgtctaataat	355 à 366
Cry1Ea	DPTN	118 à 121	gatcctactaat	352 à 363
Cry1Eb	DPTN	117 à 120	gatcctactaat	349 à 360
Cry1Fa	NPNN	118 à 121	aatcctaataat	352 à 363
Cry1Fb	NPNN	118 à 121	aatcctaataat	352 à 363
Cry1Ga	DPNN	118 à 121	gatcctaataat	352 à 363
Cry1Gb	DPDN	118 à 121	gatcctgataac	352 à 363
Cry1Ha	SPNN	122 à 125	tctcctaataat	364 à 375
Cry1Hb	SPNN	121 à 124	tctcctaataat	361 à 372
Cry1Ia	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
Cry1Ib	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
Cry1Ic	NRNN	148 à 151	aatcgtaataac	442 à 453
Cry1Id	NRNN	148 à 151	aatcgcaataac	442 à 453
Cry1Ie	NRNN	148 à 151	aatcgcaacaac	442 à 453
Cry1Ja	DPDN	119 à 122	gatcctgataac	355 à 366
Cry1Jb	TPDN	119 à 122	actccagataac	355 à 366
Cry1Ka	NRND	145 à 148	aaccgaaatgat	433 à 444

Tableau 8. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 4- alpha 5 chez les protéines Cry1

Protéine	Séquence en acides aminés	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry1Aa	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
	FLAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
Cry1Ab	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
Cry1Ac	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
Cry1Ad	FTVQNYQVPLL	148 à 158	tttacaggtcaaaattatcaagtacctcttcta	442 à 474
Cry1Ae	FTVQNYQVPLL	148 à 158	tttacaggtcaaaattatcaagtacctcttcta	442 à 474
Cry1Af	FAVQNYQVPLL	148 à 158	tttgaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
Cry1Ag	LAVQNYQVPLL	148 à 158	ttggcaggtcaaaattatcaagttcctctttta	442 à 474
Cry1Ba	FAIRNQEVPLL	167 à 177	ttcgcaattagaaccaagaagttccattattg	499 à 531
Cry1Bb	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatacgaatgaagaagttccattattg	514 à 546

Cry1Bc	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatacgaatgaagaagtccattatta	514 à 546
Cry1Bd	FRIRNEEVPLL	172 à 182	ttcagaatacgaatgaagaagtccattatta	514 à 546
Cry1Ca	FRISGFEVPLL	147 à 157	tttcgaatttctggattgaagtaccctttta	439 à 471
Cry1Cb	FRIAGFEVPLL	147 à 157	tttcgaattgctggattgaagtaccctttta	439 à 471
Cry1Da	FRVQNYEVALL	147 à 157	tttagagttcaaaattatgaagtgctctttta	439 à 471
Cry1Db	LRVRNYEVALL	147 à 157	ttaagagttcgtaattatgaagtgctctttta	439 à 471
Cry1Ea	LFSVQNYQVPFL	145 à 156	cttttttcagttcaaaattatcaagtcctttta	433 à 468
Cry1Eb	LFSVQGYEIPLL	144 à 155	cttttttcagttcaaggttatgaaattcctctttta	430 à 465
Cry1Fa	NFTLTSFEIPLL	145 à 156	aattttacacttacaagtttgaaatccctctttta	433 à 468
Cry1Fb	NFTLTSFEIPLL	145 à 156	aattttacacttacaagtttgaaatccctctttta	433 à 468
Cry1Ga	TLAIRNLEVVNLL	145 à 156	actttggcaattcggaaattctgaggtagtgaaattta	433 à 468
Cry1Gb	LMAIPGFELATL	145 à 156	cttatggcaattccagggtttgaattagctacttta	433 à 468
Cry1Ha	LREQGFIEPLL	150 à 160	ctgagagaacaaggctttgaaattcctctttta	448 à 480
Cry1Hb	LREQGFIEPLL	149 à 159	ctgagagaacagggtttgaaattcctctttta	445 à 477
Cry1Ia	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgctctggagaggaggtaccattatta	526 à 558
Cry1Ib	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgctctggagaggaggtaccattatta	526 à 558
Cry1Ic	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgctctggagaggaggtaccattatta	526 à 558
Cry1Id	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgctctggagaggaggtgccgtattta	526 à 558
Cry1Ie	FAVSGEEVPLL	176 à 186	tttgagtgatcagggtgaggaagtaccattattg	526 à 558
Cry1Ja	FRIIGFEVPLL	147 à 157	tttcggataattggatttgaagtgccactttta	439 à 471
Cry1Jb	FRIPGFEVPLL	147 à 157	tttcggattcccgatttgaagtgccacttcta	439 à 471
Cry1Ka	FSIRNEEVPLL	173 à 183	ttcagcatacgaacgaagaggttccattatta	517 à 549

Tableau 9. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 5- alpha 6 chez les protéines Cry1

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry1Aa	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaagggtggggatttgat	532 à 555
Cry1Ab	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaagggtggggatttgat	532 à 555
Cry1Ac	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaagggtggggatttgat	532 à 555
Cry1Ad	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaacgttggggatttgat	532 à 555
Cry1Ae	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaacgttggggacttgat	532 à 555
Cry1Af	CGQRSGFD	175 à 182	tgtggacaaaagggtcgggatttgat	523 à 546
Cry1Ag	FGQRWGFD	178 à 185	tttgacaaaagggtggggatttgat	532 à 555
Cry1Ba	FGSEFGLT	197 à 204	tttgtagtgaaatttgggcttaca	589 à 612
Cry1Bb	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaaatttggggatggca	604 à 627
Cry1Bc	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaaatttggggatggca	604 à 627
Cry1Bd	FGSEWGMA	202 à 209	tttgtagtgaaatttggggatggca	604 à 627
Cry1Ca	FGERWGLT	177 à 184	tttgagaaaagatggggattgaca	529 à 552
	FGERWGVV	177 à 184	tttgagaaaagatggggagtgaca	529 à 552
Cry1Cb	FGARWGLT	177 à 184	tttgagcaagatggggattgaca	529 à 552
Cry1Da	FGERWGYD	177 à 184	ttcgagaaaagatggggatgat	529 à 552

CrylDb	YGQRWGFD	177 à 184	tacggtcagagatggggccttgac	529 à 552
CrylEa	FGQAWGFD	176 à 183	tttgggcaggccttggggatttgat	526 à 549
CrylEb	FGQRWGFD	175 à 182	tttgacaacgttggggatttgat	523 à 546
CrylFa	FGQGWLGLD	176 à 183	tttgggcagggttggggacttgat	526 à 549
CrylFb	FGQGWLGLD	176 à 183	tttgggcagggttggggccttgat	526 à 549
CrylGa	FGERWGLT	176 à 183	tttgagaaaagatggggattaaca	526 à 549
CrylGb	FGERWGLT	176 à 183	tttggggagagatggggattgaca	526 à 549
CrylHa	FGQRWLGLD	180 à 187	tttgggcaaagatggggacttgac	538 à 561
CrylHb	FGQRWLGLD	179 à 186	tttgacagagatggggacttgat	535 à 558
CrylIa	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagagtggggattatca	616 à 639
CrylIb	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagaatggggattatca	616 à 639
CrylIc	FEKNGGLS	206 à 213	ttgaaaagaatggggattatca	616 à 639
CrylId	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagaatggggattgtca	616 à 639
CrylIe	FGKEWGLS	206 à 213	tttgaaaagagtggggattatct	616 à 639
CrylJa	FGERWGLT	177 à 184	tttgagagagatggggattgacg	529 à 552
CrylJb	FGERWGLT	177 à 184	ttcgagagagatggggattgacg	529 à 552
CrylKa	FGSEWGMS	203 à 210	tttgtagtgaatgggggatgtca	607 à 630

Tableau 10. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 6- alpha 7 chez les protéines Cry1

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
CrylAa	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylAb	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylAc	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylAd	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylAe	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylAf	VWGPD	215 à 219	gtatggggaccggat	643 à 657
CrylAg	VWGPD	218 à 222	gtatggggaccggat	652 à 666
CrylBa	LRGTN	237 à 241	ttgagagggacaaat	709 à 723
CrylBb	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CrylBc	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CrylBd	LRGTN	242 à 246	ttaagagggacaaat	724 à 738
CrylCa	LPKST	217 à 221	ttaccgaaatctacg	649 à 663
CrylCb	LPKST	217 à 221	ttacccaaaatctacg	649 à 663
CrylDa	LEGRF	217 à 221	ttggaaggtcgtttt	649 à 663
CrylDb	LEGSR	217 à 221	ttagagggatctcga	649 à 663
CrylEa	LPRTGG	216 à 221	ttaccacgaactggtggg	646 à 663
CrylEb	LPRNEG	215 à 220	ttaccacgtaatgaaggg	643 à 660
CrylFa	LRGTNT	216 à 221	ttaagaggtactaatact	646 à 663
CrylFb	LRGTNT	216 à 221	ttaagaggtactaatact	646 à 663
CrylGa	IGGIS	216 à 220	attggagggataagt	646 à 660

Cry1Gb	LN VIR	216 à 220	ttaaatgttataaga	646 à 660
Cry1Ha	FGGVS	220 à 224	tttggtggtgtgtca	658 à 672
Cry1Hb	FGVVT	219 à 223	tttggtgttgtaaca	655 à 669
Cry1Ia	LRGTN	246 à 250	ttgaggggtacaaat	736 à 750
Cry1Ib	LRGTN	246 à 250	ttgaggggtacaaat	736 à 750
Cry1Ic	LRATN	246 à 250	ttgagggctacaaat	736 à 750
Cry1Id	LRGTN	246 à 250	ttgaggggaacaaat	736 à 750
Cry1Ie	LRGTN	246 à 250	ttgagagggtacaaat	736 à 750
Cry1Ja	LGFRS	217 à 221	ctaggggttagatct	649 à 663
Cry1Jb	LGFTS	217 à 221	ctaggggttacttct	649 à 663
Cry1Ka	LRGTT	243 à 247	ttaagagggacaact	727 à 741

Tableau 11. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 3- alpha 4 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	NPVSSRN	153 à 159	aatcctgtgagttcacgaaat	457 à 477
Cry3Ba	APVNLRS	154 à 160	gcgctgtaaatttacgaagt	460 à 480
Cry3Bb	TPLSLRS	154 à 160	acacctttaagtttgcaagt	460 à 480
Cry3Ca	TPLTLRD	151 à 157	actccttgactttacgagat	451 à 471
Cry4Aa	NNPNPQNTQD	160 à 169	aataatccaaacccacaaaatactcaggat	478 à 507
Cry4Ba	EPNNQSYRTA	136 à 145	gagcctaataaccagtcctatagaacagca	406 à 435
Cry7Aa	KQDDPEAILS	147 à 156	aaacaagatgatccagaagctatactttct	439 à 468
Cry7Ab	NPDDPATITR	147 à 156	aatcctgatgatccagcaactataacacga	439 à 468
Cry8Aa	NRNDARTRSV	158 à 167	aatcgcaatgatgcaagaactagaagtgtt	472 à 501
Cry8Ba	NPNGSRALRD	159 à 168	aatccaaatggttcaagagccttacgagat	475 à 504
Cry8Ca	NPHSTRSAAL	159 à 168	aaccacacagtagcacgaagcgagcactt	475 à 504
Cry9Aa	NPNSASAEEL	146 à 155	aatcctaattctgcttctgctgaagaactc	436 à 465
Cry9Ba	RPNGVRANLV	134 à 143	agaccaaacggcgtaagagcaaaactagtt	400 à 429
Cry9Ca	DRNDTRNLSV	159 à 168	gatcgaaatgatacacgaaatttaagtgtt	475 à 504
Cry9Da	RPNGARASLV	159 à 168	agaccaaattggcgcaaggcgatccttagtt	475 à 504
Cry9Ea	RPNGARANLV	159 à 168	agaccgaacggagcaagagctaacttagtt	475 à 504
Cry10Aa	ARTHANAKAV	162 à 171	gcacgtacacacgctaagtctaagcagta	484 à 513
Cry16Aa	NYNPTSIDDV	109 à 118	aattataatccaacttctatagacgatgta	325 à 354
Cry17Aa	NKDDPLAIAEL	127 à 137	aataaagatgaccccttggtctatagctgaatta	379 à 411
Cry19Aa	DPKSTGNLSTL	159 à 169	gatccaaaatctacaggtaatttaagcacctta	475 à 507
Cry19Ba	NKNNFASGEL	151 à 160	aataaaaaataatttcgcaagtgtgaactt	451 à 480
Cry20Aa	ERNRTRENGQ	141 à 150	gaacgtaatagaactcgtgaaaacggacaa	421 à 450

Tableau 12. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 4- alpha 5 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	ISGYEVL	186 à 192	atttctggatacagaggttcta	556 à 576
Cry3Ba	VSKFEVL	187 à 193	gtttccaaattcgaagtctg	559 à 579
Cry3Bb	VSKFEVL	187 à 193	gtttccaaattcgaagtctg	559 à 579
Cry3Ca	VSGYEVL	184 à 190	gtctctggatacgaagtcta	550 à 570
Cry4Aa	LVNSCPPNPSCDYYNILVL	188 à 207		
			cttgtaaactctgtctcctaatacttagtgattgcgattactataacatactagtatta	562 à 621
Cry4Ba	FSNLVGYELLLL	164 à 175	tttagcaacttagtaggttatgaattattgttatta	490 à 525
Cry7Aa	FKVTGYEIPLL	175 à 185	tttaagggttactggatatgaaataccattacta	523 à 555
Cry7Ab	FRVAGYEIPLL	175 à 185	tttagggttctggatatgaaataccattacta	523 à 555
Cry8Aa	FAVSGHEVLLL	186 à 196	tttgagtagtccggacacgaagtactattatta	556 à 588
Cry8Ba	FRVTNFEVPFL	187 à 197	tttcgagtgacaaatttgaagtaccattcctt	559 à 591
Cry8Ca	FSQTNYESPLL	187 à 197	ttttctcaaacgaattatgagactccactctta	559 à 591
Cry9Aa	LTNGGSLARQNAQILL	175 à 191	ttaacgaatgggtgctcgttagctagacaaaatgcccaatattattatta	523 à 571
Cry9Ba	FGSGPGSQRFAQQL	161 à 175	tttgtagtgccctggaagtcaaagggttcaggcacaattgttg	481 à 525
Cry9Ca	FAVNGQQVPLL	187 à 197	tttgagtaaatggacagcaggtccattactg	559 à 591
Cry9Da	FGSGPGSQNYATILL	186 à 200	tttggtctgtgctcctggaagtcaaattatgcaactatattactt	556 à 600
Cry9Ea	FGTGPQSQRDAVALL	186 à 200	tttggtacgggtcctgtagtcaaagagatgcggtagcgttggtg	556 à 600
Cry10Aa	LKNNASYRIPTL	189 à 200	ttaaaaaataatgctagctatcgaataccaacactc	565 à 600
Cry16Aa	FKVKNYEVTVL	136 à 146	tttaagggttaaaattatgaagtaacagtgtta	406 à 438
Cry17Aa	FKRANYEVLLL	155 à 165	tttaaaaggcgcaattatgaagtcttactatta	463 à 495
Cry19Aa	VNNQGSPGYELLLL	187 à 200	gttaataatcaggggagtcagggttatgagttacttttattg	559 à 600
Cry19Ba	FSLGGYETVLL	180 à 190	ttctcattaggaggttatgaaacagtattatta	538 à 570
Cry20Aa	LSRRGFETLLL	173 à 183	ctttctcgagaggattcgaaactcttttatta	517 à 549

Tableau 13. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 5- alpha 6 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	GEEWGYE	215 à 221	ggagaagaatggggatacgaa	643 à 663
Cry3Ba	GEEWGYS	216 à 222	ggagaagaatggggatattct	646 à 666
Cry3Bb	GEEWGYS	216 à 222	ggagaagaatggggatattct	646 à 666
Cry3Ca	GTDWGYS	213 à 219	ggaacggattggggatattct	637 à 657
Cry4Aa	FEAYLKNNRQFDYLE	227 à 241	tttgaagcgtatttaaaaaacaatcgacaattcgattatttagag	679 à 723
Cry4Ba	LINAQEWSL	193 à 201	ctcataaatgcacaagaatggtcttta	577 à 603
	PHKCTRMVY	193 à 201	cctcataaatgcacaagaatggtctat	577 à 603
Cry7Aa	GDKWGF	206 à 211	ggagataaatggggattc	616 à 633
	GDKWEF	206 à 211	ggagataaatgggaattc	616 à 633
Cry7Ab	GDKWGF	206 à 211	ggagataaatggggattc	616 à 633
Cry8Aa	GEEWGF	217 à 222	ggagaagagtggggattt	649 à 666
Cry8Ba	GEEWGL	218 à 223	ggagaagaatggggattg	652 à 669
Cry8Ca	GKEWGY	218 à 223	gggaagggaatggggatat	652 à 669
Cry9Aa	RYGTNWGL	210 à 217	agatatggcactaattgggggcta	628 à 651
Cry9Ba1	KYGARWGL	194 à 201	aagtatggggcaagatggggactc	580 à 603
Cry9Ca	LFGEGWGF	216 à 223	cttttgagaaggatggggattc	646 à 669
Cry9Da	IYGARWGL	219 à 226	atttatggagctagatgggggctg	655 à 678
Cry9Ea	IYGARWGL	219 à 226	atctatggggcaagatggggactt	655 à 678
Cry10Aa	TYYNIWLQ	219 à 226	acctattacaatatatggctgcaa	655 à 678
Cry16Aa	IYGDAWNLYRELGF	165 à 178	atttatggagatgcatggaatttatagagaattaggattt	493 à 534
Cry17Aa	LLNKVIDNF	184 à 192	cttttaataaagttagataatttt	550 à 576
Cry19Aa	IYGDKWWSA	219 à 227	atttatggagataaatggtggagcgca	655 à 681
Cry19Ba	IYGKELG	209 à 215	atttacggaaaagaattagga	625 à 645
Cry20Aa	LYRNQWL	202 à 208	ctttatagaaatcaatgggta	604 à 624

Tableau 14. Localisation et séquence de la boucle inter-hélice alpha 6- alpha 7 chez les protéines Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 et Cry20

Protéine	Séquence en Acide aminé	Position sur la protéine	Séquence nucléotidique	Position sur le gène
Cry3Aa	RGSS	255 à 258	agaggttcact	763 à 774
Cry3Ba	RGST	256 à 259	agaggttcaact	766 à 777
Cry3Bb	RGST	256 à 259	agaggttcaact	766 à 777
Cry3Ca	RGST	253 à 256	agaggttcgact	757 à 768
Cry4Aa	LIKTPD	274 à 280	ttaattaaaacgacgcctgat	820 à 840
Cry4Ba	LRNKS	235 à 239	cttagaaataaatct	703 à 717
Cry7Aa	LNGST	245 à 249	ttgaacggttcact	733 à 747
Cry7Ab	LNGST	245 à 249	ttgaacggttcact	733 à 747
Cry8Aa	LKGTT	256 à 260	ttgaaaggtaccact	766 à 780
Cry8Ba	LKGSS	257 à 261	ttaaaaggctcgagc	769 à 783
Cry8Ca	LRGTG	257 à 261	ttaagaggaacgggt	769 à 783
Cry9Aa	LRQRGTS	252 à 258	ctaagacaacgaggcactagt	754 à 774
Cry9Ba1	LRGTS	236 à 240	ttacgaggaacgagc	706 à 720
Cry9Ca	LRGTN	257 à 261	ttaagaggaacaaat	769 à 783
Cry9Da	LRGTT	260 à 264	ttaagaggcacaacc	778 à 792
Cry9Ea	VRGTN	260 à 264	gtaagaggaacaaat	778 à 792
Cry10Aa	IRTNT	267 à 271	attagaactaatact	799 à 813
Cry16Aa	LKLDPN	210 à 215	ttaaaactagatccgaat	628 à 645
Cry17Aa	IKNKTRDF	224 à 231	ataaaaaataaaactaggatttt	670 à 693
Cry19Aa	FRTAG	261 à 265	tttagaacgcaggt	781 à 795
Cry19Ba	KKQIG	250 à 254	aaaaaacaaatagga	748 à 762
Cry20Aa	DRSS	245 à 248	gacgttcaagt	733 à 744

Des mutants peuvent être préparés pour chacun des gènes *cry* cités dans cet exemple sur le modèle des exemples 1, 2 et 3. Les procédures techniques utilisables pour la mise en oeuvre de la mutagenèse sont similaires celles présentées dans les exemples 1, 2 et 3.

Exemple 5 : Augmentation globale du contenu en leucine, phénylalanine et acide glutamique des protéines Cry

L'augmentation globale du contenu en leucine, phénylalanine et acide glutamique des protéines Cry est décrite ci-après pour la toxine Cry9Ca1. Bien que cet exemple soit réalisé sur la protéine Cry9Ca1 et le gène *cry9Ca1*, son enseignement est applicable à toutes les toxines Cry et tous les gènes *cry*. Cet enseignement s'applique notamment à toutes les toxines Cry dont la séquence est connue et déposée dans la base de données Genbank:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

Les numéros d'accèsion de Genbank des gènes *cry* sont disponibles sur le site suivant :

http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.

Cet enseignement s'applique également à toutes les toxines Cry et gènes *cry* dont la séquence n'est pas divulguée sur Genbank.

A la différence des stratégies décrites dans les exemples 1 à 4, l'objectif n'est pas de modifier une région précise de la toxine pour intégrer des acides aminés reconnus par la pepsine mais d'augmenter globalement le nombre de ces sites par augmentation du taux de leucine, de phénylalanine et d'acide glutamique dans ladite toxine. Cette stratégie permet de rendre la toxine Cry plus sensible à la pepsine en augmentant le pourcentage de résidus reconnus par la pepsine. L'acide glutamique (E-Glu) est préférentiellement substitué à l'acide aspartique (D-Asp), la phénylalanine (F-Phe) remplace préférentiellement le tryptophane (W-Trp) et la leucine (L-Leu) remplace de préférence la valine (V-Val) ou l'isoleucine (I-Ile). Cette stratégie a nécessité la création d'un modèle tridimensionnel de la toxine Cry9Ca1 activée créé à partir de la séquence primaire de la protéine par comparaison avec les structures tridimensionnelles de Cry1Aa1 et Cry3Aa1. Le modèle a été créé en utilisant le serveur Swiss-Model Protein Modelling Server (Peitsch, 1995 ; Peitsch, 1996 ; Guex and Peitsch, 1997). L'adresse du serveur est la suivante : (<http://www.expasy.ch/swissmod/swiss-model.html>).

De façon préférentielle, les substitutions doivent atteindre un niveau maximum de 25 %. La toxine Cry9Ca1 activée contient 31 acides aspartiques, 9 tryptophanes et 47 valines. Il y a naturellement 26 acides glutamiques, 35 phénylalanines et 61 leucines. En tenant compte d'un maximum de 25% de substitution pour chacun des acides aminés, les rapports relatifs sont les suivants:

Acide aminé	Nombre de résidus dans Cry9Ca1 native	Nombre de résidus dans Cry9Ca1 modifiée
Asp (D)	31	24
Glu (E)	26	33
Trp (W)	9	7
Phe (F)	35	37
Val (V)	47	36
Leu (L)	61	72

La substitution de l'isoleucine (I-Ile) par la leucine peut également être envisagée en place ou en plus de la substitution de la valine par la leucine. Il y a naturellement 27 isoleucines dans la toxine Cry9Ca1. En tenant compte d'un taux de substitution préférentiel de 25%, il suffit de remplacer 6 résidus isoleucine par des leucines.

Il est possible de modifier la séquence du gène *cry9Ca1* comme montré ci-après. La démonstration ci-après n'a pour seul objectif que d'illustrer l'exemple et ne limite en rien la portée de l'invention. Cette démonstration porte sur le remplacement de résidus acides aspartique, phénylalanines et valines. Un homme du métier peut très facilement adapter cette approche à tout autre gène *cry* dont il connaîtrait la séquence et notamment à partir des séquences disponibles sur Genbank et dont les numéros d'accessions sont mentionnés sur le site suivant:

http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Les gènes *cry* généralement exprimés dans les plantes transgéniques sont des gènes tronqués, c'est à dire que seule la séquence du gène codant pour la toxine activée est introduite dans ces plantes. Les séquences présentées dans cet exemple correspondent à cette version tronquée et s'étendent selon le cas, gène ou protéine, du codon d'initiation ou de la première méthionine à 15 codons ou acides aminés en aval du bloc conservé 5 qui limite la toxine activée.

La séquence du gène *cry9Ca1* natif et tronqué est présentée dans la SEQ ID NO 1.

La séquence de la protéine Cry9Ca1 native et tronquée est présentée dans la SEQ ID NO 2.

La séquence d'un gène *cry9Ca1* modifié dans lequel tous les codons codant pour les résidus valine, acide glutamique et phénylalanine ont été modifié est présentée dans la figure 1 (SEQ ID NO 9). Cette séquence modifiée est utilisable comme base pour la définition des divers oligonucléotides de mutagenèse pouvant être utilisés. Les bases modifiées sont représentées en caractères gras.

La séquence d'une protéine Cry9Ca1 modifiée dans laquelle tous les résidus valine, acide glutamique et phénylalanine ont été modifiés est présentée dans la figure 2 (SEQ ID NO 10)es acides aminés modifiés sont représentées en caractères gras.

L'ensemble des oligonucléotides de mutagenèse pouvant permettre de remplacer les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique sont présentés dans la figure 3 (SEQ ID NO 94 à 160). Les bases modifiées sont représentées en caractères gras.

Une possibilité d'utilisation de certains oligonucléotides pour créer un gène *cry9Ca1* modifié dont le remplacement des codons codant pour les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique a été réalisé à hauteur de 25% est présentée ci-après à titre illustratif. Cette illustration a pour objectif d'exemplifier la stratégie développée sans limiter la portée de l'invention. Sur la base de l'enseignement de cet exemple et des figures 1 à 3 (SEQ ID NO 9 et 10), l'homme du métier saura

adapter d'autres combinaisons des oligonucléotides présentés dans la figure 5 (SEQ ID NO 94 à 160) ou d'autres oligonucléotides préparés sur le même principe, en particulier pour le remplacement des résidus isoleucine.

La séquence d'un gène *cry9Ca1* modifié par remplacement des codons codant pour les résidus valine, phénylalanine et acide glutamique à hauteur de 25% est présentée dans la figure 4 (SEQ ID NO 11). Les bases modifiées sont en gras.

La séquence d'une protéine Cry9Ca1 modifiée par remplacement des résidus valine, phénylalanine et acide glutamique à hauteur de 25% est présentée dans la figure 5 (SEQ ID NO 12). Les acides aminés modifiés sont en gras.

La création d'un gène *cry9Ca1* modifiés dans lequel 25% des codons valine, phénylalanine et acide glutamique sont modifiés et dont la séquence est présentée en figure 4 (SEQ ID NO 11) peut être réalisée en utilisant, parmi ceux présentés dans la figure 5 (SEQ ID NO 94 à 160), les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide n°60
 Oligonucléotide n°62
 Oligonucléotide n°67
 Oligonucléotide n°72
 Oligonucléotide n°77
 Oligonucléotide n°78
 Oligonucléotide n°80
 Oligonucléotide n°82
 Oligonucléotide n°83
 Oligonucléotide n°88
 Oligonucléotide n°90
 Oligonucléotide n°92
 Oligonucléotide n°96
 Oligonucléotide n°97
 Oligonucléotide n°103
 Oligonucléotide n°111

La méthode préférentiellement utilisée est une mutagenèse multiple avec un mélange des oligonucléotides mentionnés immédiatement ci-dessus. La procédure de mutagenèse dirigée est similaire celle décrite dans l'exemple 1 à la seule différence qu'un mélange d'oligonucléotides de mutagenèse est utilisé dans cet exemple alors qu'un seul oligonucléotide de mutagenèse est utilisé dans l'exemple 1. Le protocole employé est celui décrit dans les exemples 1 à 4. Il est commun à

chacune des séries de mutagenèses, seuls l'oligonucléotide de mutagenèse et l'oligonucléotide d'inhibition/restauration de la résistance à l'antibiotique changent.

Exemple 6 : Production des protéines Cry modifiées dans *B. thuringiensis* et purification

Les gènes natifs et modifiés sont insérés avec leurs séquences promotrices et terminatrices dans le vecteur navette *E. coli*-*B. thuringiensis* pHT3101 (Lereclus *et al.*, 1989).

L'ADN plasmidique est préparé par minipréparation selon la technique de la lyse alcaline (Birboim et Doly, 1979). Chaque colonie bactérienne est cultivée dans 2 ml de milieu LB additionné de l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37 °C avec agitation (200 rpm). La culture est ensuite transférée dans un microtube puis centrifugée à 13500 g pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les bactéries sont resuspendues dans 100 µl d'une solution de 25mM Tris-HCl, pH 8, 10mM EDTA contenant de la Rnase A à la concentration finale de 100 µg/ml. 200 µl d'une solution de NaOH 0,2M, 1% SDS sont rajoutés et la suspension est mélangée deux fois par inversion du microtube. 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 2,55 M, pH 4,5 sont rajoutés et la suspension est incubée 5 min dans la glace. Après une centrifugation de 15 min à 13500 g, le surnageant est transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol froid. Après une centrifugation de 30 min. à 13500 g, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Le culot contenant l'ADN est séché quelques minutes sous vide puis repris dans 50 µl d'eau distillée stérile. Les échantillons sont ensuite placés à 65°C pendant 30 min.

Les digestions par endonucléases de restriction sont réalisées pour 1 µg d'ADN dans un volume final de 20 µl en présence d'un dixième de volume final de tampon 10X conseillé par le fournisseur pour chaque enzyme et à l'aide de 5 unités d'enzyme. La réaction est incubée pendant 2 à 3 h à la température optimale pour l'enzyme.

La déphosphorylation des extrémités 5' engendrées par une enzyme de restriction est réalisée avec la phosphatase alcaline d'intestin de veau. La réaction se fait en utilisant 5 µl de tampon de déphosphorylation 10X (500 mM Tris-HCl, pH 9,3, 10 mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 10 mM spermidine) et une unité d'enzyme par µg d'ADN dans un volume final de 50 µl. La réaction est incubée pendant une heure à 37°C dans la cas d'extrémités 5' sortantes ou à 55°C dans la cas d'extrémités franches ou 3' sortantes. Après la déphosphorylation, l'enzyme est ensuite inactivée pendant 30 min. à 65°C puis éliminée avec deux extractions volume à volume avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25-24-1). Les ligatures se font à l'aide de l'ADN ligase du phage T4. Elle est réalisée avec une quantité de vecteur égale à 100 ng et un rapport molaire insert/vecteur compris entre 5 et 10. Le volume final de la réaction est de 30 µl et comprend 3 µl de tampon de ligature 10X (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) et 3 unités d'enzyme. La réaction est incubée une nuit à 14°C.

La construction est insérée dans une souche acristallophore de *B. thuringiensis* selon une méthode dérivée de celle décrite en 1989 par Lereclus *et al* et décrite par ailleurs (Rang *et al.*,

1999, 2000). Une préculture de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 acristallophore est incubée une nuit à 37°C sous agitation dans 10 ml de milieu BHI (Difco). 250 ml de milieu BHI sont ensuite inoculés avec 5 ml de préculture et incubés à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la DO à 600 nm de la culture atteigne la valeur de 0,3. La culture est alors centrifugée à 1000g à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est rincé avec 50 ml d'eau distillée stérile froide. Les bactéries sont centrifugées à nouveau pendant 10 min à 1000g à 4°C. Le culot est repris dans 4 ml d'une solution froide et stérile de PEG-6000 40% et placé dans de la glace. 200 µl de bactéries sont alors mélangés avec 5 µg d'ADN plasmidique puis placées dans une cuvette d'électroporation de diamètre 0,2 cm. La cuvette est alors placée dans la chambre d'électroporation et un courant correspondant aux caractéristiques suivantes: 2,5 kV, 1000 Ω, 25 µF est délivré. Les bactéries sont ensuite récupérées, placées 10 min. dans de la glace avant d'être additionnées à 2 ml de milieu BHI et incubées à 37°C sous agitation pendant 90 min. 200 µl de culture sont alors étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu usuel (IEBC, 1994) solide additionné d'érythromycine à la concentration finale de 25 µg/ml et incubés toute une nuit à 28°C.

Les souches recombinantes de *Bacillus thuringiensis* exprimant le gène natif ou les gènes mutés sont cultivées dans 250 ml de Milieu Usuel contenant de 25 µg/ml d'érythromycine sous agitation à 28°C. La croissance des bactéries est vérifiée par observation en microscopie optique à contraste de phase. Les bactéries sont cultivées jusqu'à la lyse bactérienne après sporulation. La culture est alors centrifugée à 5000 g pendant 10 min. Le culot est lavé avec 125 ml de NaCl 1M et la suspension est à nouveau centrifugée à 5000g pendant 10 min. Le culot est alors repris dans 15 ml d'eau distillée stérile contenant 1mM de PMSF, incubé dans la glace et traité aux ultrasons (100W) pendant 1 min afin de dissocier les amas entre les spores et les cristaux. La suspension est ensuite déposée sur un gradient discontinu de NaBr composé d'une couche de 4 ml de concentration 38,5%, de 4 couches de 6 ml de 41,9%, 45,3%, 48,9% et 52,7% et d'une couche de 3 ml de 56,3%. Le gradient est alors centrifugé à 20000 g pendant 90 min à 20°C. Les différentes composantes de la suspension (spores, débris cellulaires, corps parasporaux) se positionnent dans le gradient à différents niveaux selon leur densité. Chaque bande est récupérée et lavée trois fois à l'aide d'un volume d'eau distillée stérile. Chaque bande est observée en microscopie optique à contraste de phase. La fraction contenant les corps d'inclusion est conservée à -20°C dans de l'eau distillée stérile contenant 1 mM de PMSF pour analyse ultérieure.

Exemple 7 : Analyse de la stabilité des protéines aux protéases

La première analyse de stabilité réalisée est la vérification de la stabilité à la trypsine. Les protéines présentes dans le corps d'inclusion parasporal sont solubilisées pendant une heure à 37°C dans le tampon de solubilisation (50 mM Na₂CO₃, pH 10,8, 14,6 mM 2-mercapthoethanol). La suspension est ensuite centrifugée à 14000 g pendant 10 min afin d'éliminer le matériel non

soluble. Le surnageant est alors additionné d'un dixième du volume total de trypsine 0,05% et incubé 2 h à 37°C. L'état des protéines après traitement à la trypsine est vérifié par analyse en gels de polyacrylamide-SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire grâce à la présence de SDS qui confère une charge globale négative à toutes les protéines. L'échantillon est d'abord traité en rajoutant un volume de solution de traitement 2X (125 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,01 % bleu de bromophénol) puis est dénaturé 5 min dans de l'eau bouillante. L'échantillon est ensuite déposé sur le gel et traverse d'abord un premier gel de tassement composé d'un mélange acrylamide-bisacrylamide 4%, 0,1% SDS, et de Tris-HCl 125mM, pH 6,8. L'échantillon traverse ensuite le gel de séparation composé d'acrylamide-bisacrylamide 12%, 0,1% SDS, et de Tris-HCl 375mM, pH 8,8 et qui permet la séparation des différentes protéines en fonction de leur taille. L'électrophorèse est réalisée à 100V dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glycine, 0,1% SDS) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol sorte du gel. Le gel est ensuite coloré une heure à l'aide d'une solution de méthanol 40%-acide acétique 7% contenant 0,025% de bleu de Coomassie puis décoloré à l'aide d'une solution méthanol 50%-acide acétique 10%. Le gel est définitivement fixé dans une solution de méthanol 5%-acide acétique 7%.

La seconde analyse est la vérification de la stabilité aux sucs digestifs d'insectes. Les toxines stables à la trypsine sont purifiées par FPLC (Pharmacia) à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions (Q-Sepharose) équilibrée avec une solution de 40 mM de Na₂CO₃, pH 10,7. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de 50 à 500 mM de NaCl. La DO à 280 nm des fractions est mesurée et les fractions contenant les protéines sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les fractions contenant la toxine sont rassemblées et dialysées à 4°C contre de l'eau distillée pendant environ 48h jusqu'à la précipitation des protéines. La suspension protéique est ensuite centrifugée à 8000 g et à 4°C pendant 30 min. Les toxines contenues dans le culot sont resuspendues dans de l'eau distillée puis dosées selon Bradford (1976). Elles sont ensuite réparties en fractions aliquotes de 100 µg, lyophilisées puis stockées à 4°C. Avant leur utilisation, les toxines sont solubilisées et placées à la concentration de 10 mg/ml à l'aide de Tris 25mM, pH 9,5 en vue de tester leur stabilité aux sucs digestifs de larves d'*Ostrinia nubilalis*. Le suc digestif des larves d'*O. nubilalis* peut être prélevé soit par régurgitation induite par un choc électrique selon la procédure de Ogiwara *et al.* (1992), soit par dissection des larves et collecte du jus intestinal avec une pipette selon la méthode décrite par Baines *et al.* (1994). Dans les deux cas entre 100 et 200 individus sont nécessaires à la collecte du suc digestif. Le suc collecté est centrifugé à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C avant

utilisation. La concentration en protéine du suc digestif est déterminée par la méthode de Bradford (BioRad). La réaction est conduite pendant 15 minutes à 37°C avec un rapport 1:1 (basé sur la concentration en protéine du suc digestif) de toxine et de suc digestif. La réaction est arrêtée avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitors Set, Roche Diagnostics) mélangée avec un volume équivalent de solution de traitement 2X (125 mM Tris-HCl, 20% glycérol, 4% SDS, 10%, 2-mercaptoéthanol, 0,01 % bleu de bromophénol), puis incubée 5 minutes dans de l'eau bouillante. Les protéines sont alors analysées par SDS-PAGE selon la procédure décrite ci-dessus pour déterminer leur résistance aux sucs digestifs des larves et leur état de dégradation éventuel.

Le dernier type d'analyse de stabilité réalisé est celui de la stabilité à la pepsine. Les toxines natives et modifiées lyophilisées sont dissoutes dans un tampon gastrique (0,5 mg NaCl, 1,75 ml HCl 1M dans 250 ml H₂O, pH 2.0) simulant le fluide stomacal des mammifères et contenant 0,32% de pepsine. Des échantillons sont retirés après 0, 5, 15, 60 et 240 minutes d'incubation à 37°C puis analysés par électrophorèse en gels de polyacrylamide-SDS comme décrit ci-dessus. Ces conditions sont identiques celles décrites dans le rapport d'évaluation de l'EPA (United States Environmental Protection Agency) n° 4458108.

Cette série d'analyses permet de visualiser l'état de conservation des protéines natives et mutées, et donc leur stabilité, à diverses protéases présentes chez les insectes (trypsine et sucs digestifs) et par conséquent de vérifier que les protéines mutées ont effectivement conservé leur stabilité chez l'insecte. Ces analyses permettent également de vérifier que les protéine mutées sont effectivement dégradées par la pepsine dans les conditions similaires à celles présentes dans l'estomac des mammifères.

Exemple 8 : Analyse des propriétés insecticides

L'analyse de propriétés insecticides est réalisée au travers de deux types d'expérimentations permettant de tester les deux étapes du processus de toxicité chez l'insecte : la reconnaissance du site récepteur et l'évaluation de la toxicité *in vivo*.

L'analyse de l'affinité des toxines pour le site récepteur est réalisée à l'aide de toxine radiomarquées à l'iode 125 (¹²⁵I). Les toxines activées purifiées par FPLC et lyophilisées sont reprise dans du tampon de stockage (Tris-HCl 20 mM, pH 8.6) et analysées par SDS-PAGE pour vérifier leur état. Une fraction aliquote est dosée selon la méthode de Bradford (1976). Les toxines sont iodinyllées selon la méthode de la chloramine-T (Markwell, 1982). 25 µg de toxine

sont incubés pendant 5 min à température ambiante avec 0.25 mCi de Na-¹²⁵I et une « Iodo-bead » (Pierce) dans 50 µl de tampon sodium carbonate (50 mM Na₂CO₃, pH 10). La réaction de iodinylation est ensuite déposée à la surface d'une colonne de dessalage au dextran (Pierce) équilibrées avec du tampon CBS (50 mM Na₂CO₃, pH 10,8, 150 mM NaCl) pour éliminer l'iode libre. Le marquage et la qualité de la protéine sont vérifiés par analyse par SDS-PAGE suivie d'une autoradiographie. L'activité spécifique moyenne d'une toxine marquée est de 100000 cpm/pmol.

Afin de préparer les vésicules de membrane de la bordure en brosse (BBMV) sur lesquels l'étude de l'affinité des toxines pour les récepteurs est réalisée, les insectes sont élevés jusqu'au dernier stade larvaire. L'insecte utilisé est *Ostrinia nubilalis*, mais la méthodologie mise en œuvre est applicable à toute autre espèce d'insecte. L'utilisation d'une autre espèce d'insecte nécessite d'adapter les conditions d'élevage et le milieu nutritif à chacune des espèces envisagées, ce qui est facilement réalisable par toute personne experte dans l'art. Les larves d'*Ostrinia nubilalis* sont élevées sur milieu nutritif artificiel meridic (Lewis et Lynch, 1969 ; Reed *et al.*, 1972 ; Ostlie *et al.*, 1984). La méthode d'élevage des larves d'*Ostrinia nubilalis* est celle décrite par Huang *et al.* (1997). Les larves sont élevées individuellement dans des plateaux à 128 puits (Bio-Ba-128, C-D International). Chaque puits contient 2 ml de milieu artificiel. Après dix jours les larves sont transférées dans des boîtes plus larges (18,4 cm de diamètre et 7,6 cm de hauteur) contenant 300 ml de milieu nutritif artificiel. Du carton ondulé est placé à l'intérieur en guise de site de pupaison. Lors de la phase larvaire la température de la cellule d'élevage est de 25°C avec un éclairage constant (24 h). Les cartons contenant les chrysalides sont transférés dans des cages grillagées pour l'émergence et l'élevage des adultes. Du papier ciré est déposé dans la cage pour recevoir les pontes. Les pontes sont prélevées et maintenant en attente à 15°C. L'élevage des adultes est conduit à 25°C avec 75% d'humidité relative et 14 h de photopériode.

Pour la conduite des tests d'affinité des toxines pour les sites récepteurs, les larves sont collectées en début de 5^{ème} stade larvaire et mises à jeûner pendant 6 heures. Elles sont alors prélevées et déposées sur de la glace pendant 5 minutes. Les larves sont disséquées et le tube digestif est retiré. Les tubes digestifs disséqués sont groupés par 20, déposés dans un cryotube contenant du tampon MET (300mM mannitol, 5mM EGTA, 17mM Tris-HCl, pH 7.5), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80C.

Les BBMV sont préparés selon la méthode de précipitation différentielle au magnésium (Wolfersberger *et al.*, 1987 ; Nielsen-LeRoux et Charles, 1992). Les BBMV sont repris dans du tampon TBS (20mM Tris-HCl, pH 8.5, 150mM NaCl) et la concentration totale en protéine est déterminée par la méthode de Bradford utilisant le kit Biorad et de la sérumalbumine bovine (BSA) comme standard (Bradford, 1976).

Les tests de reconnaissance de récepteurs *in vitro* sont réalisés dans des microtubes de 1,5 ml en polyéthylène dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7.4 contenant 0.15 M de NaCl et 0.1% de serumalbumine bovine (PBS/BSA). Les tests sont réalisés, en double exemplaires, à température ambiante dans un volume total de 100 µl, avec 10 µg de protéine de BBMV. Les toxine fixées sur les BBMV sont séparées des toxines libres par centrifugation à 14,000 x g pendant 10 min, à température ambiante. Les culots de chaque échantillon, contenant la toxine fixé sur la membrane, sont rincés deux fois avec 200 µl de tampon PBS/BSA (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 8.5) froid puis centrifugés. Les culots sont finalement resuspendus dans 200 µl de tampon PBS/BSA et ajoutés à 3 ml de cocktail scintillant HiSafe 3 (Pharmacia) dans une fiole à scintillation. Le comptage est réalisé dans un compteur à scintillation liquide.

Les tests de fixation directe sont conduit selon le protocole de Nielsen-LeRoux et Charles (1992). 30 µg de BBMV par microtube sont incubés avec une série de concentrations de 1 à 100 mM de toxine marquée à l'iode ^{125}I dans du tampon Tris / BSA buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.1% BSA, pH 8.5). Le taux d'accrochage non spécifique est déterminé dans des expériences parallèles en présence d'un excès de 300 fois de toxine non marquée. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante les échantillons sont centrifugés à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont rincés deux fois avec du tampon Tris/BSA froid et ressuspendus dans 150 µl du même tampon et ajoutés à 3 ml de cocktail scintillant HiSafe 3 (Pharmacia) dans une fiole à scintillation. Chaque expérience est réalisée en double et chaque point expérimental est compté deux fois dans un compteur à scintillation liquide. Les données sont analysées à l'aide du logiciel LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) commercialisé par la Société Biosoft.

Les expériences de compétition homologue sont réalisées comme décrit précédemment pour les expériences d'accrochage direct avec 10 µg de BBMV dans un volume total de 100 µl pendant 90 min à température ambiante. Les BBMV sont incubés dans une concentration fixe de 10 nM de toxine marquée à l'iode ^{125}I en présence d'une série de concentrations (de 0.1 à 300 fois la concentration de la toxine marquée) dans du tampon Tris/BSA. La valeur de l'accrochage

non spécifique (l'accrochage toujours présent en présence d'un excès de 300 fois de la toxine non marquée) est soustrait de la valeur totale comptée. Chaque expérience est réalisée en double et chaque point expérimental est compté deux fois dans un compteur à scintillation liquide. Les données sont analysées à l'aide du logiciel LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) commercialisé par la Société Biosoft.

Les tests de toxicité *in vivo* sont réalisés selon la procédure décrite par Lambert *et al.* (1996). La toxine activée et solubilisée est incorporée dans le milieu nutritif à diverses concentrations encadrant la dose létale 50% (DL₅₀) de Cry9Ca1 pour *Ostrinia nubilalis* qui est de 96,6 ng de toxine par cm² de surface de milieu. Six doses de 0,1 ng/cm², 1 ng/cm², 10 ng/cm², 100 ng/cm², 1000 ng/cm² et 10000 ng/cm² sont utilisées pour évaluer la DL₅₀ des toxines natives et modifiées. Les tests de toxicité sont réalisés sur des larves néonates dans des plaques de 24 puits de 2 cm² (Multiwell-24 plates, Corning Costar Corp.). 50 µl de chacune des dilutions de toxine sont étalés sur le milieu et séchés sous une hotte à flux. Une larve est déposée dans chaque puits et un total de 24 larves est utilisé pour chaque dose (une plaque par dose). Pour chaque dose le test est répété au moins trois fois. Un contrôle est réalisé avec de l'eau distillée. Les plaques sont couvertes et déposées à 25°C, 70% d'humidité relative et avec un photopériode 16 h. La mortalité est contrôlée après 7 jours et la DL₅₀ est calculée selon la méthode des probits (Finney, 1971).

Références bibliographiques

- Abdul-Rauf, M. and Ellar, D.J. 1999. Mutations of loop 2 and loop 3 residues in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryC δ -endotoxin affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes. *Current Microbiology*. **39**:94-98.
- Aronson, A. I., D. Wu, and C. Zhang. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* **177**:4059-4065.
- Baines, D., A. Brownright and J.L. Schwartz. 1994. Establishment of primary and continuous cultures of epithelial cells from larval lepidopteran midguts. *J. Insect. Physiol.* **40** : 347-357.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 248-254.
- Chen, X.J., Lee, M.K. and Dean, D.H. (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 9041-9045.
- Coux, F., V. Vachon, C. Rang, K. Moozar, L. Masson, M. Royer, M., Bes, S. Rivest, J.L. Schwartz, R. Laprade and R. Frutos. 1999. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of insecticidal toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. 32nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 22 - 27 August 1999, Irvine, Californie, USA.
- Crickmore, N. 2001. http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/list.html
- Crickmore, N., . Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.
- de Maagd, R. A., P. Bakker, N. Staykov, S. Dukiandjiev, W. Stiekema, and D. Bosch. 1999. Identification of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III amino acid residues involved in insect specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(10):4369-4374.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Lee, M.K., Wu, S.J., Chen, X.J., Alcantara, E., Hussain, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – a minireview. *Gene*. **179** : 111-117.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. *University Press, Cambridge*.
- Gazit, E. and Shai, Y. 1993. Structural and functional characterization of the $\alpha 5$ segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry*. **32** : 3429-3436.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R. and Cygler, M. (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254** : 447-464.

Guex, N. and Peitsch, M. C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*. **18** : 2714-2723.

Huang, F. R. A. Higgins and L. L. Buschman. 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera : Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **90** : 1137-1143.

Hussain, S. R. A., A. I. Aronson, and D. H. Dean. 1996. Substitution of residues on the proximal side of Cry1A *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins affects irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **226**(1):8-14.

Hutchinson C.A., S. Phillips, M.H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, and M.Smith. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **253**: 6551.

IEBC. 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by serotypes). Intitut Pasteur Paris

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227** : 680-685.

Lambert, B., Buysse, L., Decock, C. Jansen, S. Piens, C., Saey, B., Seurinck, J., Van Audenhove, K., van Rie, J., van Vliet, A. and Peferoen, M. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 80-86.

Lee, M.K., You, T.H., Gould, F.L., and Dean D.H. 1999. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 4513-4520.

Lereclus, D., Arantes, S.O., Chauffaux, J. and Lecadet, M.M. 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **60** : 211-217.

Lewis, L.C. and R.E. Lynch. 1969. Rearing the European corn borer on diets containing corn leaf and wheat germ. *Iowa Stae J. Sci.* **44** : 9-14.

Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353** : 815-821.

Manoj Kumar, A.S. and Aronson, A.I. 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* \square -endotoxin. *J. Bacteriol.* **181** : 6103-6107.

Markwell, M.A.K. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I-Conditions for the efficient labelling of antiserum. *Anal. Biochem.* **125**: 427-432.

Masson, L., B. E. Tabashnik, Y. B. Liu, R. Brousseau, and J. L. Schwartz. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **274**:31996-32000.

Munson, P.J. & Rodbard, D. 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239.

- Nielsen-LeRoux, C.; Charles, J.F. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* **210**: 585-590.
- Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano and H. Hori. 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut-juices of various insect larvae. *J. Invert. Pathol.* **60** : 121-126.
- Ostlie, K.R., G. L. Hein, L. G. Higley, L. V. Kaster and Showers, W. B. 1984. European corn borer (Lepidoptera : Pyralidae) development, larval survival, and adult vigor on meridic diets containing marker dies. *J. Econ. Entomol.* **77** : 118-120.
- Peitsch, M. C. 1995. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology.* **13** : 658-660.
- Peitsch, M. C. 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24** : 274-279.
- Rajamohan, F., Alcantara, E., Lee, M.K., Chen, X.J., Curtiss, A. and Dean, D.H. (1996) Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177** : 2276-2282.
- Rajamohan, F., M. K. Lee, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **60**:1-27.
- Rang, C., L. Lacey, and R. Frutos. 2000. The crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* display a synergistic activity against the codling moth, *Cydia pomonella*. *Current Microbiology* **40** : 200-204.
- Rang, C., Vachon, V., Coux, F., Carret, C., Moar, W.J., Brousseau, R., Schwartz, J.L., Laprade, R. and Frutos, R. 2001. Exchange of domain I from *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins influences protoxin stability and crystal formation. *Current Microbiology*. In Press.
- Rang, C., Vachon, V., de Maagd, R.A., Villalon, M., Schwartz, J.-L., Bosch, D., Frutos, R. and Laprade, R. 1999. Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** : 2918-2925.
- Reed, G. L., W. B. Showers, J. L. Huggans and S. W. Carter. 1972. Improved procedures for mass rearing the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* **65** : 1472-1476.
- Sambrook, J., E.F. Fritch and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 5463-5467.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Terra, W. B. and C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes : properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B** : 1-62.

Vachon, V. F. Coux, F., G. Préfontaine, C. Rang, L. Marceau, L. Masson, R. Brousseau, R. Frutos, J. L. Schwartz, and R. Laprade, R. 2000. Role of α -helix three charged residues in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. 33rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 13-18 August 2000, Guanajuato, Mexico.

Wolfersberger, M. G.; Luthy,P.; Maurer,A.; Parenti,P.; Sacchi,V.; Giordana,B.; Hanozet,G. 1987. Preparation and partial characterisation of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86**: 301-308.

Wu, S.J. and Dean D.H. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA α -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255** : 628-640

Revendications

1- Protéine Cry modifiée sensible à la pepsine, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel

2- Protéine Cry modifiée selon la revendication 1, caractérisée en ce que le site de coupure par la pepsine additionnel est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique

3- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20

4- Protéine Cry modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle est une protéine Cry9C

5- Protéine Cry modifiée selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est la protéine Cry9Ca1

6- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I

7- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle possède au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I

8- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisée en ce qu'elle possède un site de coupure par la pepsine additionnel en position 164

9- Protéine Cry modifiée selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée parmi les protéines Cry dont les séquences sont représentées par les identificateurs SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:8

10- Protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

11- Protéine Cry modifiée selon la revendication 10, caractérisée en ce que le taux de substitutions que possède ladite protéine Cry est de 25 %

12- Procédé d'augmentation de la sensibilité à la pepsine des protéines Cry, caractérisé en ce que l'on introduit au moins un site de coupure par la pepsine additionnel dans lesdites protéines Cry

13- Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le site de coupure par la pepsine additionnel introduit est représenté par un résidu acide aminé choisi parmi les résidus leucine, phénylalanine ou acide glutamique

14- Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il s'applique aux protéines Cry sélectionnées parmi les protéines Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19, ou Cry20

15- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9C

16- Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'applique à la protéine Cry9Ca1

17- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans au moins une des boucles inter-hélices alpha du domaine I desdites protéines Cry

18- Procédé selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce qu'au moins un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit dans la boucle inter-hélices alpha reliant les hélices alpha 3 et 4 du domaine I

19- Procédé selon l'une des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'un site de coupure par la pepsine additionnel est introduit en position 164

20- Procédé selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que les sites de coupure par la pepsine additionnels sont introduits par substitution de résidus acide aspartique par des résidus acide glutamique, substitution de résidus tryptophane par des résidus phénylalanine, et substitution de résidus valine ou isoleucine par des résidus leucine

21- Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le taux de substitution que possède ladite protéine Cry est inférieur ou égal à 25 %

22- Polynucléotide codant une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

23- Gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle:

- (a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte
- (b) un polynucléotide selon la revendication 22
- (c) un élément terminateur fonctionnel dans un organisme hôte

24- Gène chimère selon la revendication 23, caractérisé en ce que le promoteur et l'élément terminateur sont fonctionnels dans les plantes

25- Vecteur d'expression ou de transformation contenant un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24

26- Vecteur selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il est un plasmide, un phage ou un virus

27- Organisme hôte transformé avec l'un des vecteurs selon l'une des revendications 25 ou 26

28- Organisme hôte selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il est une plante

29- Plante selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle contient, en plus d'un gène chimère selon l'une des revendications 23 ou 24, au moins un autre gène chimère contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt

30- Partie d'une plante selon la revendication 29

31- Graines d'une plante selon la revendication 29

32- Procédé de production des protéines Cry modifiées selon l'un des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes de:

(a) mise en culture d'un organisme hôte transformé selon la revendication 27 dans un milieu de culture adapté à la croissance et à la multiplication dudit organisme

(b) extraction des protéines Cry produites par l'organisme transformé cultivé à l'étape (a)

33- Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une étape (c) de purification des protéines Cry extraites à l'étape (b)

34- Procédé selon l'une des revendications 32 ou 33, caractérisée en ce que l'organisme hôte est un microorganisme

35- Procédé selon la revendication 34, caractérisée en ce que l'organisme hôte est une bactérie *Bacillus thuringiensis*

36- Anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine Cry modifiée selon l'une des revendications 1 à 11

atgaatcgaa ataatacaaaa tgaatatgaa attattgaag cccccattg
 tgggtgtcca tcagaagaag aattaaggta tcctttggca agtgaaccaa
 atgcagcggtt acaaaatatg aactataaag aatacttaca aatgacagaa
 gaggaatata ctgaatctta tataaatcct agtttatcta ttagtggtag
 agaagcatta cagactgcgc ttactgttat taggagaata ctcggggctt
 taggtttacc gttttctgga caaatattaa gtttttatca attcctttta
 aatacactgt ttccatttaa tgaaacagct atatttgaag ctttcatgcg
 acagttagag gaacttttaa atcaacaaat aacagaattt gcaagaaatc
 aggcacttgc aagattgcaa ggattaggag aatcttttaa tttatatcaa
 cgttcccttc aaaatttttt ggctgaacga aatgaaacac gaaatttaag
 ttattacgt gctcaattta tagctttaga acttgaattt ttaaattgcta
 ttccattggt tgcattaaat ggacagcagt taccattact gtcattatat
 gcacaagctt taaatttaca ttigtattta ttaaaagaag catctctttt
 tggagaagga tttggattca cacaggggga aatttccaca tattatgaac
 gtcaattgga actaaccgct aagtacacta attactgtga aactttttat
 aatacagggt tagaacgttt aagaggaaca aatactgaaa gttttttaag
 atatcatcaa ttccgtagag aaatgacttt attattatta gaattattag
 cgtattttcc atattatgaa ttacgacttt atccaacggg atcaaaccac
 cagcttacac gtgagttata tacagaacgg attttattta atccaccagc
 taatttagga ctttgccgac gttttggtac taatccctat aatacttttt
 ctgagctoga aaatgccttc attcgccac cacatctttt tgaaaggctg
 aatagcttaa caatcagcag taatcgattt ccattatcat ctaattttat
 ggaatatatt tcaggacata cgttacgccc tagttatctg aacgaatcag
 cattacaaga agaaagtatt ggcctaatta caaccacaag agcaacaatt
 aatcccggt tagaaggaac aaaccgcata gagtcaacgg cattagaatt

FIG 1

tcgttctgca ttgataggta tatatggctt **aa**tagagct tcttttt**ttac**
caggaggctt gtttaatggt acgacttctc ctgctaattg aggatgtaga
gaactctatg **aa**acaaatga agaattacca cc**aga**aaaa gtaccggaag
ttcaacccat agactatctc att**ta**acctt ttttagcttt caaactaatc
aggctggatc tatagctaatt gcaggaagtt **tac**ctactta **tttattt**acc
cgctcg**gaat** **taga**acttaa taatacgatt accccaaata gaattacaca
attaccattg **tt**aaaggcat ctgcacct**tt** atcggggtact acg**tt**attaa
aagggtccagg atttacagga ggggggtatac tccgaagaac aactaatggc
acatttgga cgttaagatt **aacg****tt**aaat tcaccattaa cacaacaata
tcgcctaaga **tt**acgttttg cctcaacagg aaatttcagt ataagg**ttac**
tccgtggagg **gt**taactatc ggt**ga**attaa gattagggag cacaatgaac
agagggcagg aactaactta cgaatccttt ttcacaagag agtttactac
tactggtccg ttcaatccgc cttttacatt tacacaagct caagagattc
taacatt**taaa** tgcagaaggt **tt**aagcaccg gtggtgaata ttatatag**aa**
agaattgaaa ttt**ta**acct**tt** **aa**atccggca cgagaagcgg aagagg**gaatt**
agaagcggcg aagaaagcg

FIG 1 (Suite)

MNRNNQNEYE IIEAPHCGCP SEEELRYPLA SEPNAALQNM NYKEYLQMT
EYTESYINP SLSISGREAL QTALTLLGRI LGALGLPFSG QILSFYQFLL
NTLFPLNETA IFEAFMRQLE ELLNQQITEF ARNQALARLQ GLGESFNLYQ
RSLQNFLAER NETRNLSLLR AQFIALELEF LNAIPLFALN GQQLPLLSLY
AQALNLHLLL LKEASLFGEG FGFTQGEIST YYERQLELTA KYTNYCETFY
NTGLERLRGT NTESFLRYHQ FRREMTLLLL ELLALFPYYE LRLYPTGSNP
QLTRELYTEP ILFNPPANLG LCRRFGTNPY NTFSELENAF IRPPHLFERL
NSLTISSNRF PLSSNFMEYF SGHTLRRSYL NESALQEESEY GLITTTTRATI
NPGLEGTNRI ESTALEFRSA LIGIYGLNRA SFLPGGLFNG TTSPANGGCR
ELYETNEELP PEESTGSSTH RLSHLTFFSF QTNQAGSIAN AGSLPTYLEFT
RRELELNNTI TPNRITQLPL LKASAPLSGT TLLKGPFGTG GGILRRTTNG
TFGTLRLTLN SPLTQQYRLR LRFASTGNFS IRLLRGGLSI GELRLGSTMN
RGQELTYESF FTREFTTTGP FNPPFTFTQA QEILTLNAEG LSTGGEYYIE
RIEILPLNPA REAEEEELEAA KKA

FIG 2

Oligonucléotide n°53 : tgaatatgaaattattga**ag**ccccccattg

Oligonucléotide n°54 : tgggtgtccatcaga**agaagaatta**aggtatcctttggca

Oligonucléotide n°55 : tcctttggcaagtga**ac**caaatgcagc

Oligonucléotide n°56 : gaactataaaga**ata**cttacaaatg

Oligonucléotide n°57 : caaatgacaga**agagga**atacactga

Oligonucléotide n°58 : tacactga**at**cttatataaa

Oligonucléotide n°59 : tattagtggtagaga**agcattac**agactgcgcttac

Oligonucléotide n°60 : cagactgcgcttactgtt**atta**ggagaataactcggg

Oligonucléotide n°61 : gggcttttaggt**ttacc**gttttctgg

Oligonucléotide n°62 : ttctggacaaat**atta**agtttttatcaa

Oligonucléotide n°63 : cttttaatacactgt**ttccatt**aaatga**aac**agctatat

Oligonucléotide n°64 : acagctatat**ttga**agctttcatg

Oligonucléotide n°65 : ctttcatgcgacag**ttag**aggaactt

Oligonucléotide n°66 : gaggaact**tt**aaatcaacaaataac

Oligonucléotide n°67 : ggattaggaga**at**cttttaat

Oligonucléotide n°68 : tcttttaat**ttat**atcaacgttc

Oligonucléotide n°69 : ccttcaaaat**tttt**ggctga

Oligonucléotide n°70 : ttggctga**ac**gaaatga

Oligonucléotide n°71 : cgaaatga**aac**acgaaatttaag

Oligonucléotide n°72 : acacgaaatttaagt**ttattac**gtgctcaatttatag

Oligonucléotide n°73 : gctcaatttatagcttttaga**acttga**atttt**ta**aatgctattccattg

Oligonucléotide n°74 : ccattgtttgcat**ta**aatggacagcag

Oligonucléotide n°75 : aatggacagcag**ttacc**attactgtca

Oligonucléotide n°76 : ccattactgtcat**ttat**atgcacaagct

Oligonucléotide n°77 : tatgcacaagct**tt**aaatttacattt

Oligonucléotide n°78 : ttattaaaaga**ag**catctctttt

Oligonucléotide n°79 : tggagaaggat**ttgg**attcacacag

Oligonucléotide n°80 : cacatattatga**ac**gtcaattgga

FIG 3

Oligonucléotide n°81 : tactgtgaaactttttataatacaggtt
Oligonucléotide n°82 : tacagggttagaacgtttaagagga
Oligonucléotide n°83 : aatactgaaagttttttaagatatcatc
Oligonucléotide n°84 : gtagagaaatgactttattattattagaattatttagcgctatttccatatt
Oligonucléotide n°85 : tttccatattatgaattacgactttatccaac
Oligonucléotide n°86 : cttacacgtgagttatatacaga
Oligonucléotide n°87 : tatacagaaccgattttattttaatccacc
Oligonucléotide n°88 : ccaccagctaatttaggactttgccgac
Oligonucléotide n°89 : ctttgccgacgttttggtactaatccc
Oligonucléotide n°90 : catctttttgaaaggctgaatag
Oligonucléotide n°91 : taatcgatttccattatcatctaattttat
Oligonucléotide n°92 : ctaattttatggaatatttttcaggacatacggtac
Oligonucléotide n°93 : tagttatctgaacgaatcagcattacaagaaga
Oligonucléotide n°94 : caagaagaaagttatggcct
Oligonucléotide n°95 : caattaatcccggattagaaggaacaaaccgcata
Oligonucléotide n°96 : gagtcaacggcattagaatttcggttctgca
Oligonucléotide n°97 : ggtatatatggcttaaatagagcttc
Oligonucléotide n°98 : tagagcttcttttttaccaggagggttgtt
Oligonucléotide n°99 : ctgctaattggaggatgtagagaactctatga
Oligonucléotide n°100 : ctctatgaaacaaatga
Oligonucléotide n°101 : acaaatgaagaattaccacc
Oligonucléotide n°102 : attaccaccagaagaaaagtaccggaag
Oligonucléotide n°103 : agactatctcatttaaccttttttagcttt
Oligonucléotide n°104 : gctaattgcaggaagttacctacttat
Oligonucléotide n°105 : cctacttatttatttaccgctcgtga
Oligonucléotide n°106 : acccgctcgtgaattagaacttaataatacgatt
Oligonucléotide n°107 : attaccattgttaaaggcatctgc
Oligonucléotide n°108 : aaggcatctgcaccttatcggtactacg

FIG 3 (suite)

Oligonucléotide n°109 : tcgggtactacg**tt**attaaaaggtccagg
Oligonucléotide n°110 : acatttggaacggttaagat**tt**aacg**tt**aattcaccattaa
Oligonucléotide n°111 : cacaacaatatcgcttaagat**tt**acgttttgcctcaac
Oligonucléotide n°112 : aaatttcagtataagg**tt**actccgtggaggg
Oligonucléotide n°113 : ctccgtggagg**gt**atctatcggatga
Oligonucléotide n°114 : tctatcggatga**att**aagattagggagcac
Oligonucléotide n°115 : caagagattctaacat**tt**aatgcagaagg
Oligonucléotide n°116 : aatgcagaagg**tt**aagcaccggtggtgaata
Oligonucléotide n°117 : gtggtgaatattatataga**aa**gaattgaaatt
Oligonucléotide n°118 : agaattgaaatt**tt**ac**ct****tt**aatccggcacgagaag
Oligonucléotide n°119 : cgagaagcggaagagga**att**agaagcggcg

FIG 3 (suite)

atgaatcgaa ataatcaaaa tgaatatgaa attattgatg cccccattg
 tgggtgtcca tcagatgacg atgtgaggta tcctttggca agtgacccaa
 atgcagcggtt acaaaatatg aactataaag attacttaca aatgacagat
 gaggactaca ctgattotta tataaatcct agtttatcta ttagtggtag
 agatgcagtt cagactgcgc ttactg**ttat** taggagaata ctcggggctt
 taggtgttcc gttttctgga caaatat**taa** gtttttatca attcctttta
 aatacactgt ggccagttaa tgatacagct atatgggaag ctttcatgcg
 acaggtggag gaacttgtca atcaacaaat aacagaattt gcaagaaatc
 aggcaactgc aagattgcaa ggattaggag **aat**cttttaa tgtatatcaa
 cgttcccttc aaaattgggt ggctgatcga aatgatacac gaaatttaag
tttattacgt gctcaattta tagctttaga ccttgatttt gttaatgcta
 ttccattggt tgcagtaa at ggacagcagg ttccattact gtcagtatat
 gcacaagctt **t**aaatttaca tttgttatta ttaaa**gaag** catctctttt
 tggagaagga tggggattca cacaggggga aatttccaca tattat**gaac**
 gtcaattgga actaacgct aagtacacta attactgtga aacttggat
 aatacaggtt tag**gaac**gttt aagaggaaca aatactgaaa gt**tttt**taag
 atatcatcaa ttccgtagag aaatgacttt agtggtatta gatgttgtgg
 cgctatttcc atattatgat gtacgacttt atccaacggg atcaaaccac
 cagcttacac gtgagggtata tacagatccg attgtattta atccaccagc
 taat**tt**agga ctttgccgac gttgggttac taatccctat aatacttttt
 ctgagctcga aaatgccttc attcgccac cacatctttt **tgaa**aggctg
 aatagcttaa caatcagcag taatcgattt ccagtttcat ctaattttat
ggaatatttt tcaggacata cgttacgccg tagttatctg aacgattcag
 cagtacaaga agatagttat ggcctaatta caaccacaag agcaacaatt
 aatcccggag ttgatggaac aaaccgcata gagtcaacgg **cattagaatt**
 tcgttctgca ttgataggta tatatggctt **aa**atagagct tcttttgtcc
 caggaggctt gtttaattgt acgacttctc ctgctaattg aggatgtaga
 gatctctatg atacaaatga tgaattacca ccagatgaaa gtaccggaag

FIG 4

ttcaacccat agactatctc att**ta**acctt ttttagcttt caaactaatc
aggctggatc tatagctaata gcaggaagtg tacctactta tgtttggacc
cgctcgtgatg tggaccttaa taatacgatt accccaaata gaattacaca
attaccattg gtaaaggcat ctgcacctgt ttcgggtact acggtcttaa
aagggtccagg atttacagga gggggtatac tccgaagaac aactaatggc
acatttggaa cgttaagagt aacggttaat tcaccattaa cacaacaata
tcgcctaaga **ttac**gttttg cctcaacagg aaatttcagt ataagggtac
tccgtggagg ggtttctatc ggtgatgtta gattagggag cacaatgaac
agagggcagg aactaactta cgaatccttt ttcacaagag agtttactac
tactgggtccg ttcaatccgc cttttacatt tacacaagct caagagattc
taacagtgaa tgcagaaggt gttagcaccg gtggtgaata ttatatagat
agaattgaaa ttgtccctgt gaatccggca cgagaagcgg aagaggattt
agaagcggcg aagaaagcg

FIG 4 (suite)

MNRNNQNEYE IIDAPHCSCP SDDDVRYPLA SDPNAALQNM NYKDYLQMTD
EDYTDSYINP SLSISGRDAV QTALT**LL**GRI LGALGVPFSG QILSFYQFLL
NTLWPFVNDTA IWEAFMRQVE ELVNQQITEF ARNQALARLQ GLG**ES**FNVYQ
RSLQNLADR NDTRNLS**LLR** AQFIALDLDF VNAIPLFAVN GQQVPLLSVY
AQALNLHLLL LK**E**ASLFGEG WGFTQGEIST YY**ER**QLELTA KYTNYCETWY
NTGL**ER**LRGT NTES**FL**RYHQ FRREMTLVVL DVVALFPYYD VRLYPTGSPN
QLTREVYTDI IVFNPPAN**LG** LCRRWGTPY NTFSELENAF IRPPHL**F**ERL
NSLTISSNRF PVSSNFM**EYF** SGHTLRRSYL NDSAVQEDSY GLITTTTRATI
NPGVDGTPRI ESTALE**FR**SA LIGIYGL**N**RA SFVPGGLFNG TTSPANGGCR
DLYDTNDELP PDESTGSSTH RLSHL**T**FFSF QTNQAGSIAN AGSVPTYVWT
RRDVDLNNTI TPNRITQLPL VKASAPVSGT TVLKGPFTG GGILRRTTNG
TFGTLRVTVN SPLTQQYRLR **L**RFASTGNFS IRVLRGGVSI GDVRLGSTMN
RGQELTYESF FTREFTTTGP FNPPFTFTQA QEILTVNAEG VSTGGEYYID
RIEIVPVNPA REAEEDLEAA KKA

FIG 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> Aventis CropScience SA

<120> Toxine insecticide de *Bacillus thuringiensis* modifiée
sensible à la pepsine

<130> PRO 01002

<140>

<141>

<160> 160

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2019

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 1

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	

tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca cga aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt	768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg	
245 250 255	
tta aga gga aca aat act gaa agt tgg tta aga tat cat caa ttc cgt	816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg	
260 265 270	
aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat	864
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr	
275 280 285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt	912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg	
290 295 300	
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat gtt gga	960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly	
305 310 315 320	
ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc	1008
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu	
325 330 335	
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gat agg ctg aat agc	1056
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser	
340 345 350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gat	1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp	
355 360 365	
tat tgg tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca	1152
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala	
370 375 380	

gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att	1200
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile	
385 390 395 400	
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat	1248
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp	
405 410 415	
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt	1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe	
420 425 430	
gtc cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga	1344
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly	
435 440 445	
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt	1392
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser	
450 455 460	
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat gtt acc ttt ttt agc ttt	1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe	
465 470 475 480	
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt gta cct act	1488
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr	
485 490 495	
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca	1536
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro	
500 505 510	
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tcg	1584
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser	
515 520 525	
ggg act acg gtc tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc	1632
Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu	
530 535 540	
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga gta acg gtt aat	1680
Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn	
545 550 555 560	
tca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga gtt cgt ttt gcc tca aca	1728
Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr	
565 570 575	
gga aat ttc agt ata agg gta ctc cgt gga ggg gtt tct atc ggt gat	1776
Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp	
580 585 590	
gtt aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa	1824
Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu	
595 600 605	
tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct	1872
Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro	
610 615 620	
ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca gtg aat gca gaa ggt	1920

Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640

 gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct 1968
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655

 gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

 gcg 2019
 Ala

 <210> 2
 <211> 673
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

 <400> 2
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15

 Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

 Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
 35 40 45

 Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60

 Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
 65 70 75 80

 Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
 85 90 95

 Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110

 Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
 115 120 125

 Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp
 130 135 140

 Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160

 Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175

 Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
 180 185 190

 Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu
 195 200 205

 Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr

210	215	220
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg	Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225	230	235 240
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg		
	245	250 255
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg		
	260	265 270
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr		
	275	280 285
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg		
	290	295 300
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly		
	305	310 315 320
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu		
	325	330 335
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser		
	340	345 350
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp		
	355	360 365
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala		
	370	375 380
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile		
	385	390 395 400
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp		
	405	410 415
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe		
	420	425 430
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly		
	435	440 445
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser		
	450	455 460
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe		
	465	470 475 480
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr		
	485	490 495
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro		
	500	505 510
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser		
	515	520 525
Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu		
	530	535 540

Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670
 Ala

<210> 3
 <211> 2019
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Leu-164

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2019)

<400> 3
 atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat 48
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15
 tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac 96
 Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30
 cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg 144
 Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
 35 40 45
 aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att 192
 Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60
 agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata 240
 Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile

65	70	75	80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat				288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr				
	85	90	95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg				336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp				
	100	105	110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca				384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr				
	115	120	125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac				432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp				
	130	135	140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga				480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg				
	145	150	155	160
aat gat aca tta aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta				528
Asn Asp Thr Leu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu				
	165	170	175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag				576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln				
	180	185	190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg				624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu				
	195	200	205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca				672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr				
	210	215	220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct				720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala				
	225	230	235	240
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt				768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg				
	245	250	255	
tta aga gga aca aat act gaa agt tgg tta aga tat cat caa ttc cgt				816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg				
	260	265	270	
aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat				864
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr				
	275	280	285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt				912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg				
	290	295	300	
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat gtt gga				960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly				
	305	310	315	320

ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc	1008
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu	
325 330 335	
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gat agg ctg aat agc	1056
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser	
340 345 350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gat	1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp	
355 360 365	
tat tgg tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca	1152
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala	
370 375 380	
gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att	1200
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile	
385 390 395 400	
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat	1248
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp	
405 410 415	
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt	1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe	
420 425 430	
gtc cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga	1344
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly	
435 440 445	
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt	1392
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser	
450 455 460	
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat gtt acc ttt ttt agc ttt	1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe	
465 470 475 480	
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt gta cct act	1488
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr	
485 490 495	
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca	1536
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro	
500 505 510	
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tcg	1584
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser	
515 520 525	
ggg act acg gtc tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc	1632
Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu	
530 535 540	
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga gta acg gtt aat	1680
Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn	
545 550 555 560	

tca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga gtt cgt ttt gcc tca aca 1728
Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
565 570 575

gga aat ttc agt ata agg gta ctc cgt gga ggg gtt tct atc ggt gat 1776
Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
580 585 590

gtt aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa 1824
Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
595 600 605

tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct 1872
Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
610 615 620

ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca gtg aat gca gaa ggt 1920
Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct 1968
Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
645 650 655

gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

gcg 2019
Ala

<210> 4
<211> 673
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Leu-164

<400> 4
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
1 5 10 15
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
20 25 30
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
35 40 45
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
50 55 60
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
65 70 75 80
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
85 90 95
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
100 105 110
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr

115					120					125						
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp	
130					135					140						
Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg	
145					150					155					160	
Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu	
165					170					175						
Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln	
180					185					190						
Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu	
195					200					205						
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr	
210					215					220						
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala	
225					230					235					240	
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	
245					250					255						
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg	
260					265					270						
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr	
275					280					285						
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg	
290					295					300						
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly	
305					310					315					320	
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	
325					330					335						
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser	
340					345					350						
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Asp	
355					360					365						
Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala	
370					375					380						
Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	
385					390					395					400	
Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Val	Asp	
405					410					415						
Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	
420					425					430						
Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly	
435					440					445						

Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670
 Ala

<210> 5

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Phe-164

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 5

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca ttt aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Phe Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt	768

Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg		
				245					250					255			
tta	aga	gga	aca	aat	act	gaa	agt	tgg	tta	aga	tat	cat	caa	ttc	cgt	816	
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg		
			260					265					270				
aga	gaa	atg	act	tta	gtg	gta	tta	gat	gtt	gtg	gcg	cta	ttt	cca	tat	864	
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr		
		275					280					285					
tat	gat	gta	cga	ctt	tat	cca	acg	gga	tca	aac	cca	cag	ctt	aca	cgt	912	
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg		
	290					295				300							
gag	gta	tat	aca	gat	ccg	att	gta	ttt	aat	cca	cca	gct	aat	gtt	gga	960	
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly		
305					310				315					320			
ctt	tgc	cga	cgt	tgg	ggg	act	aat	ccc	tat	aat	act	ttt	tct	gag	ctc	1008	
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu		
				325				330					335				
gaa	aat	gcc	ttc	att	cgc	cca	cca	cat	ott	ttt	gat	agg	ctg	aat	agc	1056	
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser		
			340					345					350				
tta	aca	atc	agc	agt	aat	cga	ttt	cca	gtt	tca	tct	aat	ttt	atg	gat	1104	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Arg	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Asn	Phe	Met	Asp		
		355				360						365					
tat	tgg	tca	gga	cat	acg	tta	cgc	cgt	agt	tat	ctg	aac	gat	tca	gca	1152	
Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Arg	Arg	Ser	Tyr	Leu	Asn	Asp	Ser	Ala		
	370					375				380							
gta	caa	gaa	gat	agt	tat	ggc	cta	att	aca	acc	aca	aga	gca	aca	att	1200	
Val	Gln	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile		
385					390				395					400			
aat	ccc	gga	gtt	gat	gga	aca	aac	cgc	ata	gag	tca	acg	gca	gta	gat	1248	
Asn	Pro	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Asn	Arg	Ile	Glu	Ser	Thr	Ala	Val	Asp		
			405					410					415				
ttt	cgt	tct	gca	ttg	ata	ggg	ata	tat	ggc	gtg	aat	aga	gct	tct	ttt	1296	
Phe	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe		
		420				425						430					
gtc	cca	gga	ggc	ttg	ttt	aat	ggg	acg	act	tct	cct	gct	aat	gga	gga	1344	
Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gly	Gly		
		435				440					445						
tgt	aga	gat	ctc	tat	gat	aca	aat	gat	gaa	tta	cca	cca	gat	gaa	agt	1392	
Cys	Arg	Asp	Leu	Tyr	Asp	Thr	Asn	Asp	Glu	Leu	Pro	Pro	Asp	Glu	Ser		
	450				455						460						
acc	gga	agt	tca	acc	cat	aga	cta	tct	cat	gtt	acc	ttt	ttt	agc	ttt	1440	
Thr	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Arg	Leu	Ser	His	Val	Thr	Phe	Phe	Ser	Phe		
	465				470				475					480			
caa	act	aat	cag	gct	gga	tct	ata	gct	aat	gca	gga	agt	gta	cct	act	1488	
Gln	Thr	Asn	Gln	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Pro	Thr		

485										490										495										
tat	gtt	tgg	acc	cgt	cgt	gat	gtg	gac	ctt	aat	aat	acg	att	acc	cca	1536														
Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Thr	Pro															
500					505					510																				
aat	aga	att	aca	caa	tta	cca	ttg	gta	aag	gca	tct	gca	cct	gtt	tcg	1584														
Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser															
515					520					525																				
ggt	act	acg	gtc	tta	aaa	ggt	cca	gga	ttt	aca	gga	ggg	ggt	ata	ctc	1632														
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu															
530					535					540																				
cga	aga	aca	act	aat	ggc	aca	ttt	gga	acg	tta	aga	gta	acg	gtt	aat	1680														
Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Val	Asn															
545					550					555					560															
tca	cca	tta	aca	caa	caa	tat	cgc	cta	aga	gtt	cgt	ttt	gcc	tca	aca	1728														
Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr															
565					570					575																				
gga	aat	ttc	agt	ata	agg	gta	ctc	cgt	gga	ggg	gtt	tct	atc	ggt	gat	1776														
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp															
580					585					590																				
gtt	aga	tta	ggg	agc	aca	atg	aac	aga	ggg	cag	gaa	cta	act	tac	gaa	1824														
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu															
595					600					605																				
tcc	ttt	ttc	aca	aga	gag	ttt	act	act	act	ggt	cgc	ttc	aat	cgc	cct	1872														
Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro															
610					615					620																				
ttt	aca	ttt	aca	caa	gct	caa	gag	att	cta	aca	gtg	aat	gca	gaa	ggt	1920														
Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	Glu	Gly															
625					630					635					640															
gtt	agc	acc	ggt	ggt	gaa	tat	tat	ata	gat	aga	att	gaa	att	gtc	cct	1968														
Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Ile	Val	Pro															
645					650					655																				
gtg	aat	cgc	gca	cga	gaa	gcg	gaa	gag	gat	tta	gaa	gcg	gcg	aag	aaa	2016														
Val	Asn	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys															
660					665					670																				
gcg															2019															
Ala																														

<210> 6

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Phe-164

<400> 6

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His

1

5

10

15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp

20					25					30					
Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met
		35					40					45			
Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile
	50					55					60				
Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Gln	Thr	Ala	Leu	Thr	Val	Val	Gly	Arg	Ile
	65					70					75				80
Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ser	Gly	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr
				85					90					95	
Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Trp	Pro	Val	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Trp
			100					105					110		
Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr
		115					120					125			
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp
		130				135					140				
Ser	Phe	Asn	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Ala	Asp	Arg
	145					150					155				160
Asn	Asp	Thr	Phe	Asn	Leu	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu
				165					170					175	
Asp	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Asn	Gly	Gln
			180					185					190		
Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Ala	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	His	Leu
		195					200					205			
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Phe	Thr
		210				215					220				
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala
	225					230					235				240
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg
			245						250					255	
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Trp	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg
			260					265					270		
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr
		275					280					285			
Tyr	Asp	Val	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg
	290					295					300				
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ile	Val	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Val	Gly
	305					310					315				320
Leu	Cys	Arg	Arg	Trp	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu
				325					330					335	
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Asp	Arg	Leu	Asn	Ser
			340					345					350		

Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp
 355 360 365
 Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380
 Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 7

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Glu-164

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 7

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac	96
Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gat gca gtt cag act gcg ctt act gtt gtt ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata gtg agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gac	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp	
130 135 140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca gaa aat tta agt gtt gtt cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Glu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	

gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct gtg aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gat gca tct ctt ttt gga gaa gga tgg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gac cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gat cgt	768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg	
245 250 255	
tta aga gga aca aat act gaa agt tgg tta aga tat cat caa ttc cgt	816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg	
260 265 270	
aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat	864
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr	
275 280 285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt	912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg	
290 295 300	
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat gtt gga	960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly	
305 310 315 320	
ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc	1008
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu	
325 330 335	
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gat agg ctg aat agc	1056
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser	
340 345 350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gat	1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp	
355 360 365	
tat tgg tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca	1152
Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala	
370 375 380	
gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att	1200
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile	
385 390 395 400	
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat	1248
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp	
405 410 415	

ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt	1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe	
420 425 430	
gtc cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga	1344
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly	
435 440 445	
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt	1392
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser	
450 455 460	
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat gtt acc ttt ttt agc ttt	1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe	
465 470 475 480	
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt gta cct act	1488
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr	
485 490 495	
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca	1536
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro	
500 505 510	
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tcg	1584
Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser	
515 520 525	
ggg act acg gtc tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc	1632
Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu	
530 535 540	
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga gta acg gtt aat	1680
Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn	
545 550 555 560	
tca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga gtt cgt ttt gcc tca aca	1728
Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr	
565 570 575	
gga aat ttc agt ata agg gta ctc cgt gga ggg gtt tct atc ggt gat	1776
Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp	
580 585 590	
gtt aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa	1824
Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu	
595 600 605	
tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct	1872
Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro	
610 615 620	
ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca gtg aat gca gaa ggt	1920
Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly	
625 630 635 640	
gtt agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gat aga att gaa att gtc cct	1968
Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro	
645 650 655	
gtg aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gat tta gaa gcg gcg aag aaa	2016

Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

gcg
 Ala

2019

<210> 8

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1 Glu-164

<400> 8

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15

Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met
 35 40 45

Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
 50 55 60

Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly Arg Ile
 65 70 75 80

Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser Phe Tyr
 85 90 95

Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110

Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
 115 120 125

Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp
 130 135 140

Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160

Asn Asp Thr Glu Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175

Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
 180 185 190

Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu His Leu
 195 200 205

Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr
 210 215 220

Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240

Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asp Arg
 245 250 255

Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Val Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Asp
 355 360 365
 Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380
 Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575

Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
580 585 590

Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
595 600 605

Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
610 615 620

Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
645 650 655

Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

Ala

<210> 9

<211> 2019

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-100%

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2019)

<400> 9

atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gaa gcc ccc cat	48
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Glu Ala Pro His	
1 5 10 15	
tgt ggg tgt cca tca gaa gaa gaa tta agg tat cct ttg gca agt gaa	96
Cys Gly Cys Pro Ser Glu Glu Glu Leu Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Glu	
20 25 30	
cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gaa tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Glu Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gaa gag gaa tac act gaa tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Glu Glu Glu Tyr Thr Glu Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gaa gca tta cag act gcg ctt act gtt att agg aga ata	240
Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Val Ile Arg Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt tta ccg ttt tct gga caa ata tta agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Leu Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg ttt cca tta aat gaa aca gct ata ttt	336

Gln	Phe	Leu	Leu	Asn	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Asn	Glu	Thr	Ala	Ile	Phe		
			100					105					110				
gaa	gct	ttc	atg	cga	cag	tta	gag	gaa	ctt	tta	aat	caa	caa	ata	aca	384	
Glu	Ala	Phe	Met	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr		
		115					120					125					
gaa	ttt	gca	aga	aat	cag	gca	ctt	gca	aga	ttg	caa	gga	tta	gga	gaa	432	
Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Glu		
		130				135					140						
tct	ttt	aat	tta	tat	caa	cgt	tcc	ctt	caa	aat	ttt	ttg	gct	gaa	cga	480	
Ser	Phe	Asn	Leu	Tyr	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asn	Phe	Leu	Ala	Glu	Arg		
145					150					155					160		
aat	gaa	aca	cga	aat	tta	agt	tta	tta	cgt	gct	caa	ttt	ata	gct	tta	528	
Asn	Glu	Thr	Arg	Asn	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Ala	Gln	Phe	Ile	Ala	Leu		
				165					170					175			
gaa	ctt	gaa	ttt	tta	aat	gct	att	cca	ttg	ttt	gca	tta	aat	gga	cag	576	
Glu	Leu	Glu	Phe	Leu	Asn	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Leu	Asn	Gly	Gln		
			180					185					190				
cag	tta	cca	tta	ctg	tca	tta	tat	gca	caa	gct	tta	aat	tta	cat	ttg	624	
Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Ser	Leu	Tyr	Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	His	Leu		
		195					200					205					
tta	tta	tta	aaa	gaa	gca	tct	ctt	ttt	gga	gaa	gga	ttt	gga	ttc	aca	672	
Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Phe	Gly	Glu	Gly	Phe	Gly	Phe	Thr		
		210				215					220						
cag	ggg	gaa	att	tcc	aca	tat	tat	gaa	cgt	caa	ttg	gaa	cta	acc	gct	720	
Gln	Gly	Glu	Ile	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Arg	Gln	Leu	Glu	Leu	Thr	Ala		
225					230					235					240		
aag	tac	act	aat	tac	tgt	gaa	act	ttt	tat	aat	aca	ggt	tta	gaa	cgt	768	
Lys	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Cys	Glu	Thr	Phe	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg		
				245					250					255			
tta	aga	gga	aca	aat	act	gaa	agt	ttt	tta	aga	tat	cat	caa	ttc	cgt	816	
Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Thr	Glu	Ser	Phe	Leu	Arg	Tyr	His	Gln	Phe	Arg		
			260					265					270				
aga	gaa	atg	act	tta	tta	tta	tta	gaa	tta	tta	gcg	cta	ttt	cca	tat	864	
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Ala	Leu	Phe	Pro	Tyr		
		275					280					285					
tat	gaa	tta	cga	ctt	tat	cca	acg	gga	tca	aac	cca	cag	ctt	aca	cgt	912	
Tyr	Glu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Pro	Gln	Leu	Thr	Arg		
		290				295					300						
gag	tta	tat	aca	gaa	ccg	att	tta	ttt	aat	cca	cca	gct	aat	tta	gga	960	
Glu	Leu	Tyr	Thr	Glu	Pro	Ile	Leu	Phe	Asn	Pro	Pro	Ala	Asn	Leu	Gly		
305					310					315					320		
ctt	tgc	cga	cgt	ttt	ggt	act	aat	ccc	tat	aat	act	ttt	tct	gag	ctc	1008	
Leu	Cys	Arg	Arg	Phe	Gly	Thr	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu		
				325					330					335			
gaa	aat	gcc	ttc	att	cgc	cca	cca	cat	ctt	ttt	gaa	agg	ctg	aat	agc	1056	
Glu	Asn	Ala	Phe	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Phe	Glu	Arg	Leu	Asn	Ser		

340	345	350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca tta tca tct aat ttt atg gaa Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Leu Ser Ser Asn Phe Met Glu 355 360 365			1104
tat ttt tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gaa tca gca Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Glu Ser Ala 370 375 380			1152
tta caa gaa gaa agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile 385 390 395 400			1200
aat ccc gga tta gaa gga aca aac cgc ata gag tca acg gca tta gaa Asn Pro Gly Leu Glu Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Leu Glu 405 410 415			1248
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc tta aat aga gct tct ttt Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Arg Ala Ser Phe 420 425 430			1296
tta cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga Leu Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly 435 440 445			1344
tgt aga gaa ctc tat gaa aca aat gaa gaa tta cca cca gaa gaa agt Cys Arg Glu Leu Tyr Glu Thr Asn Glu Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ser 450 455 460			1392
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat tta acc ttt ttt agc ttt Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe 465 470 475 480			1440
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt tta cct act Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Leu Pro Thr 485 490 495			1488
tat tta ttt acc cgt cgt gaa tta gaa ctt aat aat acg att acc cca Tyr Leu Phe Thr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro 500 505 510			1536
aat aga att aca caa tta cca ttg tta aag gca tct gca cct tta tcg Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ala Pro Leu Ser 515 520 525			1584
ggt act acg tta tta aaa ggt cca gga ttt aca gga ggg ggt ata ctc Gly Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu 530 535 540			1632
cga aga aca act aat ggc aca ttt gga acg tta aga tta acg tta aat Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Leu Thr Leu Asn 545 550 555 560			1680
tca cca tta aca caa caa tat cgc cta aga tta cgt ttt gcc tca aca Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr 565 570 575			1728
gga aat ttc agt ata agg tta ctc cgt gga ggg tta tct atc ggt gaa Gly Asn Phe Ser Ile Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Ser Ile Gly Glu 580 585 590			1776

```

tta aga tta ggg agc aca atg aac aga ggg cag gaa cta act tac gaa 1824
Leu Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
595 600 605

tcc ttt ttc aca aga gag ttt act act act ggt ccg ttc aat ccg cct 1872
Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
610 615 620

ttt aca ttt aca caa gct caa gag att cta aca tta aat gca gaa ggt 1920
Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Leu Asn Ala Glu Gly
625 630 635 640

tta agc acc ggt ggt gaa tat tat ata gaa aga att gaa att tta cct 1968
Leu Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Glu Arg Ile Glu Ile Leu Pro
645 650 655

tta aat ccg gca cga gaa gcg gaa gag gaa tta gaa gcg gcg aag aaa 2016
Leu Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ala Ala Lys Lys
660 665 670

gcg 2019
Ala

```

<210> 10

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-100%

<400> 10

```

Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Glu Ala Pro His
1 5 10 15

```

```

Cys Gly Cys Pro Ser Glu Glu Glu Leu Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Glu
20 25 30

```

```

Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Glu Tyr Leu Gln Met
35 40 45

```

```

Thr Glu Glu Glu Tyr Thr Glu Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile
50 55 60

```

```

Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Val Ile Arg Arg Ile
65 70 75 80

```

```

Leu Gly Ala Leu Gly Leu Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr
85 90 95

```

```

Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Phe Pro Leu Asn Glu Thr Ala Ile Phe
100 105 110

```

```

Glu Ala Phe Met Arg Gln Leu Glu Glu Leu Leu Asn Gln Gln Ile Thr
115 120 125

```

```

Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu
130 135 140

```

```

Ser Phe Asn Leu Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Phe Leu Ala Glu Arg
145 150 155 160

```

Asn Glu Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175
 Glu Leu Glu Phe Leu Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Leu Asn Gly Gln
 180 185 190
 Gln Leu Pro Leu Leu Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Phe Gly Phe Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240
 Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Phe Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg
 245 250 255
 Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Leu Leu Leu Glu Leu Leu Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Glu Leu Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Leu Tyr Thr Glu Pro Ile Leu Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Phe Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Leu Ser Ser Asn Phe Met Glu
 355 360 365
 Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Glu Ser Ala
 370 375 380
 Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Leu Glu Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Leu Glu
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Leu Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Glu Leu Tyr Glu Thr Asn Glu Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480

Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Leu Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Leu Phe Thr Arg Arg Glu Leu Glu Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ala Pro Leu Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Leu Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Leu Thr Leu Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Leu Leu Arg Gly Gly Leu Ser Ile Gly Glu
 580 585 590
 Leu Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Leu Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Leu Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Glu Arg Ile Glu Ile Leu Pro
 645 650 655
 Leu Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670

Ala

<210> 11
 <211> 2019
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-25%

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2019)

<400> 11
 atg aat cga aat aat caa aat gaa tat gaa att att gat gcc ccc cat 48
 Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Pro His
 1 5 10 15
 tgt ggg tgt cca tca gat gac gat gtg agg tat cct ttg gca agt gac 96
 Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala Ser Asp
 20 25 30

cca aat gca gcg tta caa aat atg aac tat aaa gat tac tta caa atg	144
Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu Gln Met	
35 40 45	
aca gat gag gac tac act gat tct tat ata aat cct agt tta tct att	192
Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu Ser Ile	
50 55 60	
agt ggt aga gaa gca tta cag act gcg ctt acg tta tta ggg aga ata	240
Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Leu Leu Gly Arg Ile	
65 70 75 80	
ctc ggg gct tta ggt gtt ccg ttt tct gga caa ata tta agt ttt tat	288
Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr	
85 90 95	
caa ttc ctt tta aat aca ctg tgg cca gtt aat gat aca gct ata tgg	336
Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp	
100 105 110	
gaa gct ttc atg cga cag gtg gag gaa ctt gtc aat caa caa ata aca	384
Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr	
115 120 125	
gaa ttt gca aga aat cag gca ctt gca aga ttg caa gga tta gga gaa	432
Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu	
130 135 140	
tct ttt aat gta tat caa cgt tcc ctt caa aat tgg ttg gct gat cga	480
Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg	
145 150 155 160	
aat gat aca cga aat tta agt tta tta cgt gct caa ttt ata gct tta	528
Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu	
165 170 175	
gac ctt gat ttt gtt aat gct att cca ttg ttt gca gta aat gga cag	576
Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln	
180 185 190	
cag gtt cca tta ctg tca gta tat gca caa gct tta aat tta cat ttg	624
Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu	
195 200 205	
tta tta tta aaa gaa gca tct ctt ttt gga gaa gga ttg gga ttc aca	672
Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr	
210 215 220	
cag ggg gaa att tcc aca tat tat gaa cgt caa ttg gaa cta acc gct	720
Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala	
225 230 235 240	
aag tac act aat tac tgt gaa act tgg tat aat aca ggt tta gaa cgt	768
Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg	
245 250 255	
tta aga gga aca aat act gaa agt ttt tta aga tat cat caa ttc cgt	816
Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg	
260 265 270	

aga gaa atg act tta gtg gta tta gat gtt gtg gcg cta ttt cca tat	864
Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr	
275 280 285	
tat gat gta cga ctt tat cca acg gga tca aac cca cag ctt aca cgt	912
Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg	
290 295 300	
gag gta tat aca gat ccg att gta ttt aat cca cca gct aat tta gga	960
Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly	
305 310 315 320	
ctt tgc cga cgt tgg ggt act aat ccc tat aat act ttt tct gag ctc	1008
Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu	
325 330 335	
gaa aat gcc ttc att cgc cca cca cat ctt ttt gaa agg ctg aat agc	1056
Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser	
340 345 350	
tta aca atc agc agt aat cga ttt cca gtt tca tct aat ttt atg gaa	1104
Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Glu	
355 360 365	
tat ttt tca gga cat acg tta cgc cgt agt tat ctg aac gat tca gca	1152
Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala	
370 375 380	
gta caa gaa gat agt tat ggc cta att aca acc aca aga gca aca att	1200
Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile	
385 390 395 400	
aat ccc gga gtt gat gga aca aac cgc ata gag tca acg gca gta gat	1248
Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp	
405 410 415	
ttt cgt tct gca ttg ata ggt ata tat ggc gtg aat aga gct tct ttt	1296
Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe	
420 425 430	
gtc cca gga ggc ttg ttt aat ggt acg act tct cct gct aat gga gga	1344
Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly	
435 440 445	
tgt aga gat ctc tat gat aca aat gat gaa tta cca cca gat gaa agt	1392
Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser	
450 455 460	
acc gga agt tca acc cat aga cta tct cat tta acc ttt ttt agc ttt	1440
Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe	
465 470 475 480	
caa act aat cag gct gga tct ata gct aat gca gga agt gta cct act	1488
Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr	
485 490 495	
tat gtt tgg acc cgt cgt gat gtg gac ctt aat aat acg att acc cca	1536
Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro	
500 505 510	
aat aga att aca caa tta cca ttg gta aag gca tct gca cct gtt tcg	1584

Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Val	Ser		
		515					520					525					
ggt	act	acg	gtc	tta	aaa	ggt	cca	gga	ttt	aca	gga	ggg	ggt	ata	ctc	1632	
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Leu		
		530				535					540						
cga	aga	aca	act	aat	ggc	aca	ttt	gga	acg	tta	aga	gta	acg	gtt	aat	1680	
Arg	Arg	Thr	Thr	Asn	Gly	Thr	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Val	Thr	Val	Asn		
545					550					555					560		
tca	cca	tta	aca	caa	caa	tat	cgc	cta	aga	tta	cgt	ttt	gcc	tca	aca	1728	
Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Phe	Ala	Ser	Thr		
				565					570					575			
gga	aat	ttc	agt	ata	agg	gta	ctc	cgt	gga	ggg	gtt	tct	atc	ggt	gat	1776	
Gly	Asn	Phe	Ser	Ile	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Gly	Asp		
			580					585					590				
gtt	aga	tta	ggg	agc	aca	atg	aac	aga	ggg	cag	gaa	cta	act	tac	gaa	1824	
Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Tyr	Glu		
		595					600					605					
tcc	ttt	ttc	aca	aga	gag	ttt	act	act	act	ggt	ccg	ttc	aat	ccg	cct	1872	
Ser	Phe	Phe	Thr	Arg	Glu	Phe	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Phe	Asn	Pro	Pro		
		610				615					620						
ttt	aca	ttt	aca	caa	gct	caa	gag	att	cta	aca	gtg	aat	gca	gaa	ggt	1920	
Phe	Thr	Phe	Thr	Gln	Ala	Gln	Glu	Ile	Leu	Thr	Val	Asn	Ala	Glu	Gly		
625					630					635					640		
gtt	agc	acc	ggt	ggt	gaa	tat	tat	ata	gat	aga	att	gaa	att	gtc	cct	1968	
Val	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Ile	Val	Pro		
				645					650					655			
gtg	aat	ccg	gca	cga	gaa	gcg	gaa	gag	gat	tta	gaa	gcg	gcg	aag	aaa	2016	
Val	Asn	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys		
			660					665					670				
gcg																2019	
Ala																	

<210> 12

<211> 673

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: Cry9Ca1-25%

<400> 12

Met	Asn	Arg	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Pro	His
1				5					10					15	

Cys	Gly	Cys	Pro	Ser	Asp	Asp	Asp	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Ala	Ser	Asp
			20					25					30		

Pro	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asn	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met
		35					40					45			

Thr	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Leu	Ser	Ile
	50					55					60				

Ser Gly Arg Glu Ala Leu Gln Thr Ala Leu Thr Leu Leu Gly Arg Ile
 65 70 75 80
 Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Leu Ser Phe Tyr
 85 90 95
 Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala Ile Trp
 100 105 110
 Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln Ile Thr
 115 120 125
 Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Glu
 130 135 140
 Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala Asp Arg
 145 150 155 160
 Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Leu Leu Arg Ala Gln Phe Ile Ala Leu
 165 170 175
 Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn Gly Gln
 180 185 190
 Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Leu Asn Leu His Leu
 195 200 205
 Leu Leu Leu Lys Glu Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly Phe Thr
 210 215 220
 Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Glu Arg Gln Leu Glu Leu Thr Ala
 225 230 235 240
 Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg
 245 250 255
 Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Phe Leu Arg Tyr His Gln Phe Arg
 260 265 270
 Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe Pro Tyr
 275 280 285
 Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu Thr Arg
 290 295 300
 Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn Leu Gly
 305 310 315 320
 Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Leu
 325 330 335
 Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Glu Arg Leu Asn Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe Met Glu
 355 360 365
 Tyr Phe Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ala
 370 375 380

Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala Thr Ile
 385 390 395 400
 Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala Val Asp
 405 410 415
 Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala Ser Phe
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn Gly Gly
 435 440 445
 Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp Glu Ser
 450 455 460
 Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Leu Thr Phe Phe Ser Phe
 465 470 475 480
 Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val Pro Thr
 485 490 495
 Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile Thr Pro
 500 505 510
 Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro Val Ser
 515 520 525
 Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly Ile Leu
 530 535 540
 Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr Val Asn
 545 550 555 560
 Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Leu Arg Phe Ala Ser Thr
 565 570 575
 Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile Gly Asp
 580 585 590
 Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr Tyr Glu
 595 600 605
 Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn Pro Pro
 610 615 620
 Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala Glu Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile Val Pro
 645 650 655
 Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Lys Lys
 660 665 670
 Ala

<210> 13

<211> 30

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 1

<400> 13
gaattaaatg aattttttaa tttaagtgtt 30

<210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 2

<400> 14
gaattaaatg aattatttaa tttaagtgtt 30

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 3

<400> 15
gaattattag aattttttatt attaagtgtt 30

<210> 16
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 4

<400> 16
gaattattag aattattatt attaagtgtt 30

<210> 17
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 5

<400> 17
gaattattag aagaattatt attaagtgtt 30

<210> 18
<211> 30
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 6

<400> 18

gaacgattag aatTTTTatt attaagtgtt

30

<210> 19

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 7

<400> 19

gaacgattag aattattatt attaagtgtt

30

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 8

<400> 20

gaattagaag aattattatt attaagtgtt

30

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 9

<400> 21

gaattattag aagaagaaga attaagtgtt

30

<210> 22

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 10

<400> 22

TTTTTattaa atttattttt ttaccatta ctg

33

<210> 23

<211> 33

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant11

<400> 23
tttttattaa atttagaaga attaccatta ctg 33

<210> 24
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 12

<400> 24
tttgaagaaa atttagaaga attaccatta ctg 33

<210> 25
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 13

<400> 25
tttgaagaaa attttttatt atttccatta ctg 33

<210> 26
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 14

<400> 26
tttgaagaaa attttgaaga atttccatta ctg 33

<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 15

<400> 27
tttttattaa attttgaaga atttccatta ctg 33

<210> 28
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 16

<400> 28

tttttattaa atgaattttt tgaaccatta ctg

33

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 17

<400> 29

cttttttttag aattattttt attc

24

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 18

<400> 30

cttttttttat tattattttt attc

24

<210> 31

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 19

<400> 31

cttttttttag aagaatttga atta

24

<210> 32

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 20

<400> 32

ctttttgaag aagaatttga atta

24

<210> 33

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 21

<400> 33

ctttttgaag aattatttga agaa

24

<210> 34

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 22

<400> 34

ttattagaat taaat

15

<210> 35

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 23

<400> 35

ttattatttt taaat

15

<210> 36

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 24

<400> 36

ttagaattat taaat

15

<210> 37

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 25

<400> 37

ttattatttt ttaat

15

<210> 38

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: mutant 26

<400> 38
ttagaagaat taaat 15

<210> 39
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 27

<400> 39
ttagaatttt taaat 15

<210> 40
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 28

<400> 40
ttagaatttg aaaat 15

<210> 41
<211> 15
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mutant 29

<400> 41
ttagaagaag aaaat 15

<210> 42
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 1

<400> 42
gatcgaaatg atacattaaa tttaagtgtt gtt 33

<210> 43
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:

oligonucléotide 2

<400> 43
gatcgaaatg atacatttaa tttaagtgtt gtt 33

<210> 44
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 3

<400> 44
gatcgaaatg atacagaaaa tttaagtgtt gtt 33

<210> 45
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 4

<400> 45
cgaaatgata cacgattatt aagtgttggt cgt 33

<210> 46
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 5

<400> 46
cgaaatgata cagagaatt aagtgttggt cgt 33

<210> 47
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 6

<400> 47
ttggctgata gaaatgaatt tttaaattta agtgttggt 39

<210> 48
<211> 39
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 7

<400> 48

ttggctgatc gaaatgaatt tttattatta agtggtggt

39

<210> 49

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 8

<400> 49

ttggctgatc gaaatgaatt attaaattta agtggtggt

39

<210> 50

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 9

<400> 50

ttggctgatc gaaatgaatt attattatta agtggtggt

39

<210> 51

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 10

<400> 51

ttggctgatc gaaatgaaga agaagaatta agtggtggt

39

<210> 52

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 11

<400> 52

ttggctgatc gaaatgaaga attattatta agtggtggt

39

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 12

<400> 53
caaaattggt tggctgaatt aaatgaatta ttaaat 36

<210> 54
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 13

<400> 54
caaaattggt tggctgaatt aaatgaattt ttaaat 36

<210> 55
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 14

<400> 55
caaaattggt tggctgaatt attagaattt ttattatta 39

<210> 56
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 15

<400> 56
caaaattggt tggctgaatt attagaatta ttattatta 39

<210> 57
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 16

<400> 57
caaaattggt tggctgaatt attagaagaa ttattatta 39

<210> 58
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 17

<400> 58
caaaattggt tggctgaacg attagaattt ttattatta 39

<210> 59
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 18

<400> 59
caaaattggt tggctgaacg attagaatta ttattatta 39

<210> 60
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 19

<400> 60
caaaattggt tggctgaatt agaagaatta ttattatta 39

<210> 61
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 20

<400> 61
caaaattggt tggctgaatt attagaagaa gaagaatta 39

<210> 62
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 21

<400> 62
gctattccat tgtttttatt aaatggacag caggtt 36

<210> 63
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 22

<400> 63
gctattccat tgtttgaaga aaatggacag caggtt 36

<210> 64
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 23

<400> 64
ttattaaatg gacagcagtt accattactg tcagta 36

<210> 65
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 24

<400> 65
ttattaaatg gacagcagtt tccattactg tcagta 36

<210> 66
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 25

<400> 66
ttattaaatg gacagcagga accattactg tcagta 36

<210> 67
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 26

<400> 67
gaagaaaatg gacagcagtt accattactg tcagta 36

<210> 68
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 27

<400> 68
gaagaaaatg gacagcagtt tccattactg tcagta 36

<210> 69
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 28

<400> 69
ccattgtttt tattaaattt atttttttta ccattactgt cagta 45

<210> 70
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 29

<400> 70
ccattgtttt tattaaattt agaagaatta ccattactgt cagta 45

<210> 71
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 30

<400> 71
ccattgtttg aagaaaattt agaagaatta ccattactgt cagta 45

<210> 72
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 31

<400> 72
ccattgtttg aagaaaattt tttattattt ccattactgt cagta 45

<210> 73
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 32

<400> 73
ccattgtttg aagaaaattt tgaagaattt ccattactgt cagta 45

<210> 74
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 33

<400> 74
ccattgtttt tattaaattt tgaagaattt ccattactgt cagta 45

<210> 75
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 34

<400> 75
ccattgtttt tattaaatga attttttgaa ccattactgt cagta 45

<210> 76
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 35

<400> 76
gatgcatctc tttttttaga aggatgggga ttc 33

<210> 77
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 36

<400> 77
gatgcatctc tttttttatt aggatgggga ttcaca 36

<210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 37

<400> 78
gatgcatctc tttttgaaga aggatgggga ttc 33

<210> 79
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 38

<400> 79
ttagaaggat ggggattaac acagggggaa att 33

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 39

<400> 80
gaagaaggat ggggagaaac acagggggaa att 33

<210> 81

<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 40

<400> 81
gcatctcttt ttttagaatt atttttattc acacaggggg aaatt 45

<210> 82
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 41

<400> 82
gcatctcttt ttttattatt atttttattc acacaggggg aaatt 45

<210> 83
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 42

<400> 83
gcatctcttt ttttagaatt atttttattc acacaggggg aaatt 45

<210> 84
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 43

<400> 84
gcatctcttt ttgaagaatt atttttattc acacaggggg aaatt 45

<210> 85
<211> 45
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 44

<400> 85

gcacatctcttt ttgaagaatt atttttagaa acacaggggg aaatt 45

<210> 86

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 45

<400> 86

ggtttagatc gtttattaga attaaatact gaaagttgg 39

<210> 87

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 46

<400> 87

ggtttagatc gtttattatt tttaaatact gaaagttgg 39

<210> 88

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 47

<400> 88

ggtttagatc gtttagaatt attaaatact gaaagttgg 39

<210> 89

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 48

<400> 89

ggtttagatc gtttattatt ttttaatact gaaagttgg 39

<210> 90

<211> 39

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 49

<400> 90
ggtttagatc gttagaaga attaaatact gaaagttgg 39

<210> 91
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 50

<400> 91
ggtttagatc gttagaatt tttaaatact gaaagttgg 39

<210> 92
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 51

<400> 92
ggtttagatc gttagaatt tgaaaatact gaaagttgg 39

<210> 93
<211> 39
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 52

<400> 93
ggtttagatc gttagaaga agaaaatact gaaagttgg 39

<210> 94
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 53

<400> 94
tgaatatgaa attattgaag cccccattg 30

<210> 95
<211> 40

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 54

 <400> 95
 tgggtgtcca tcagaagaag aattaaggta tcctttggca 40

 <210> 96
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 55

 <400> 96
 tcctttggca agtgaaccaa atgcagc 27

 <210> 97
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 56

 <400> 97
 gaactataaaa gaatacttac aaatg 25

 <210> 98
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 57

 <400> 98
 caaatgacag aagaggaata cactga 26

 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 58

 <400> 99
 tacactgaat cttatataaa 20

<210> 100
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 59

<400> 100
tattagtgggt agagaagcat tacagactgc gcttac 36

<210> 101
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 60

<400> 101
cagactgcgc ttactgttat tagggagaat actcggg 37

<210> 102
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 61

<400> 102
gggctttagg tttaccgttt tctgg 25

<210> 103
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 62

<400> 103
ttctggacaa atattaagtt tttatcaa 28

<210> 104
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:

oligonucléotide 63

<400> 104
cttttaaata cactgtttcc attaaatgaa acagctatat 40

<210> 105
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 64

<400> 105
acagctatat ttgaagcttt catg 24

<210> 106
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 65

<400> 106
ctttcatgcg acagtttagag gaactt 26

<210> 107
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 66

<400> 107
gaggaacttt taaatcaaca aataac 26

<210> 108
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 67

<400> 108
ggattaggag aatcttttaa t 21

<210> 109
<211> 23
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 68

<400> 109

tcttttaatt tatatcaacg ttc

23

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 69

<400> 110

ccttcaaaat tttttggctg a

21

<210> 111

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 70

<400> 111

ttggctgaac gaaatga

17

<210> 112

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 71

<400> 112

cgaaatgaaa cacgaaattt aag

23

<210> 113

<211> 37

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 72

<400> 113

acacgaaatt taagtttatt acgtgctcaa tttatag

37

<210> 114
<211> 48
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 73

<400> 114
gctcaattta tagctttaga acttgaattt ttaaattgcta ttccattg

48

<210> 115
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 74

<400> 115
ccattgtttg cattaaatgg acagcag

27

<210> 116
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 75

<400> 116
ccattgtttg cattaaatgg acagcag

27

<210> 117
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 76

<400> 117
ccattactgt cattatatgc acaagct

27

<210> 118
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 77

<400> 118
tatgcacaag ctttaaattt acatttg 27

<210> 119
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 78

<400> 119
ttattaaaag aagcatctct ttt 23

<210> 120
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 79

<400> 120
tggagaagga tttggattca cacag 25

<210> 121
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 80

<400> 121
cacatattat gaacgtcaat tgga 24

<210> 122
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 81

<400> 122
tactgtgaaa ctttttataa tacagggt 28

<210> 123
<211> 25
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 82

 <400> 123
 tacagggttta gaacgtttaa gagga 25

<210> 124
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 83

 <400> 124
 aatactgaaa gttttttaag atatcatc 28

<210> 125
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 84

 <400> 125
 gtagagaaat gactttatta ttattagaat tattagcgct atttccatat t 51

<210> 126
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 85

 <400> 126
 atattatgaa ttacgacttt atccaac 27

<210> 127
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 oligonucléotide 86

 <400> 127
 cttacacgtg agttatatac aga 23

<210> 128
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 87

<400> 128
tatacagaac cgattttatt taatccacc 29

<210> 129
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 88

<400> 129
ccaccagcta atttaggact ttgccgac 28

<210> 130
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 89

<400> 130
ctttgccgac gttttgtac taatccc 27

<210> 131
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 90

<400> 131
catctttttg aaaggctgaa tag 23

<210> 132
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 91

<400> 132
taatcgattt ccattatcat ctaattttat 30

<210> 133
<211> 36
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 92

<400> 133
ctaattttat ggaatatttt tcaggacata cgttac 36

<210> 134
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 93

<400> 134
tagttatctg aacgaatcag cattacaaga aga 33

<210> 135
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 94

<400> 135
caagaagaaa gttatgcct 20

<210> 136
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 95

<400> 136
caattaatcc cggattagaa ggaacaaacc gcata 35

<210> 137
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 96

<400> 137
gagtcaacgg cattagaatt tcgttctgca 30

<210> 138
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 97

<400> 138
ggtatatatg gcttaaataag agcttc 26

<210> 139
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 98

<400> 139
tagagcttct tttttaccag gaggcttggt 30

<210> 140
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 99

<400> 140
ctgctaattg aggatgtaga gaactctatg a 31

<210> 141
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 100

<400> 141
ctctatgaaa caaatga 17

<210> 142

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 101

<400> 142
acaaatgaag aattaccacc 20

<210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 102

<400> 143
attaccacca gaagaaagta ccggaag 27

<210> 144
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 103

<400> 144
agactatctc atttaacctt ttttagcttt 30

<210> 145
<211> 27
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 104

<400> 145
gctaatgcag gaagtttacc tacttat 27

<210> 146
<211> 26
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 105

<400> 146

cctacttatt tatttaccgc tcgtga 26

<210> 147
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 106

<400> 147
accgcgcgcg aattagaact taataatagc att 33

<210> 148
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 107

<400> 148
attaccattg ttaaaggcat ctgc 24

<210> 149
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 108

<400> 149
aaggcatctg cacctttatc gggtactacg 30

<210> 150
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 109

<400> 150
tcgggtacta cgttattaaa aggtccagg 29

<210> 151
<211> 40
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 110

<400> 151
acatttgga cgtaagatt aacgttaaatt caccattaa 40

<210> 152
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 111

<400> 152
cacaacaata tcgcctaaga ttacgttttg cctcaac 37

<210> 153
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 112

<400> 153
aaatttcagt ataaggttac tccgtggagg g 31

<210> 154
<211> 35
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 113

<400> 154
ataagggtac tccgtggagg gttatctatc ggtga 35

<210> 155
<211> 29
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 114

<400> 155
tctatcggtg aattaagatt agggagcac 29

<210> 156
<211> 30

<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 115

<400> 156
caagagattc taacattaaa tgcagaaggt 30

<210> 157
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 116

<400> 157
aatgcagaag gtttaagcac cgggtggtgaa ta 32

<210> 158
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 117

<400> 158
gtggtgaata ttatatagaa agaattgaaa tt 32

<210> 159
<211> 37
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 118

<400> 159
agaattgaaa ttttaccttt aaatccggca cgagaag 37

<210> 160
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucléotide 119

<400> 160
cgagaagcgg aagaggaatt agaagcggcg 30

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL WO 99 31248 A (WALTERS FREDERICK S ;ENGLISH LEIGH (US); MONSANTO CO (US); BRYSON) 24 juin 1999 (1999-06-24) WO 94 24264 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV ;LAMBERT BART (BE); JANSENS STEFAN (BE);) 27 octobre 1994 (1994-10-27) SEQ ID NO:5	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	